



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Diversidade de bactérias causadoras de podridão mole em
hortaliças no estado de Pernambuco**

Alessandra Jackeline Guedes de Moraes

**Recife – PE
2018**

ALESSANDRA JACKELINE GUEDES DE MORAES

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE PODRIDÃO MOLE EM
HORTALIÇAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientador(a): Prof^ª Dr^ª Elineide Barbosa de Souza

Coorientador(a): Prof^ª Dr^ª Rosa de Lima Ramos Mariano

**RECIFE-PE
FEVEREIRO - 2018**

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE PODRIDÃO MOLE EM
HORTALIÇAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

ALESSANDRA JACKELINE GUEDES DE MORAES

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/02/2014.

ORIENTADOR:

Profº Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

EXAMINADORES(AS):

Dr. Alexandre Sandri Capucho (UNIVASF)

Dra. Anna Carolina Soares Almeida (UFRPE)

Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE)

Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2018**

Aos meus pais, Francisco e Marilene Moraes, pelo exemplo de vida, amor e dedicação. As minhas irmãs Gabriela e Markilene, meu cunhado Bruno, aos meus sobrinhos Carol, Beatriz, Leticia, Giovanna e Benjamim, pelo carinho, amor e incentivo.

OFEREÇO

Ao meu esposo Paulo, meus filhos Yohan, Lorena e Heitor, pelo incentivo, amor, paciência, e sobretudo por compreender a minha ausência. Ao meu anjo da guarda, Rosana Pinheiro, pela dedicação e carinho com a minha família.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me dado amor, perseverança, paciência e força para realizar mais esta etapa na minha vida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional, e a CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Marco Gama pela orientação, dedicação, atenção e confiança depositada durante o doutorado.

Às Professoras Elineide Barbosa de Souza e Rosa de Lima Ramos Mariano pelos ensinamentos, amizade, amor, confiança e por serem exemplos de vida, meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Adriano Marcio Freire Silva pela amizade, ensinamentos e atenção despendida durante os trabalhos desenvolvidos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia (PPGF) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelos conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários da Área de Fitossanidade: Darci Martins e Romildo Angeiras, pela ajuda e amizade despendida ao longo do curso.

À Heidi Lacerda, do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio, dedicação e amizade.

Aos meus queridos amigos Iwanne Coelho, Jessica Silva, Gerusa Santos, Wilson Junior, Beatriz Cruz, Rayanne Moraes, Luiz Lopes, Kledson Mendes, Moara Bandeira, Claudeana Souza, Joseane Castro e Bruno Brabo pela amizade, confiança e companheirismo.

Aos meus companheiros do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE: Edilaine Melo, Grecy Miriam, Ana Karolina Leite, Alba Suastes, Ana Dulce Botelho, Bárbara Ribeiro, Willams Oliveira, Gessyka Rodrigues, Lucas Pontes, Antônio Roberto Farias, Emanuel Feitosa, Leandro Silva, Leandro Velez e Pedro Rodrigues, por todos os momentos compartilhados dentro e fora do LAFIBAC, muito obrigado.

Ao senhor Luiz Coelho, pelo apoio durante os trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação. A todos que participaram desta caminhada e contribuíram para a minha formação e realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO GERAL.....	VIII
GENERAL ABSTRACT	IX
CAPÍTULO I.....	10
DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE PODRIDÃO MOLE EM HORTALIÇAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO.....	11
INTRODUÇÃO GERAL	
1. Importância das hortaliças.....	11
2. Podridão mole	12
3. Enterobacteriaceas causadoras de podridão mole.....	14
4. Técnicas moleculares utilizadas para classificação de bactérias e identificação de bactérias.....	17
5. Estrutura genética de população.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO II	
Diversidade de bactérias pectinolíticas causadoras de podridão mole em hortaliças oriundas de diferentes zonas climáticas do Nordeste brasileiro.....	38
Resumo.....	39
Abstract.....	40
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	44
Discussão.....	47
Conclusões.....	50
Agradecimentos.....	50
Referências.....	51
CAPÍTULO III	
First report of <i>Pectobacterium aroidearum</i> and <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> causing soft rot of <i>Cucurbita pepo</i> L. in Brazil.....	79
Referencias.....	80

CAPÍTULO IV

Estrutura genética de populações de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> obtidas de hortaliças cultivadas em diferentes zonas climáticas no estado de Pernambuco, Brasil.....	83
Resumo.....	83
Abstract.....	84
Materiais e Métodos.....	85
Resultados.....	89
Discussão.....	91
Conclusões.....	93
Agradecimentos.....	93
Referências.....	93
CONCLUSÕES GERAIS.....	109

RESUMO GERAL

A podridão mole é uma doença responsável por causar perdas significativas na produção de diversas plantas cultivadas. O presente trabalho teve como objetivos: i) identificar as bactérias causadoras de podridão mole em diferentes hortaliças no estado de Pernambuco por meio da região 16S rDNA e MLSA com os genes *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA*, *gyrA*, *ropS*, *recA*, *dnaX*, *fusA* e *rplB* e (ii) analisar a estrutura genética da população prevalente em Pernambuco (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*) utilizando-se a técnica de rep-PCR. Por meio de análises de BLASTn da região 16S rDNA, foi observado que na coleção de 177 isolados, além de espécies e subespécies de *Pectobacterium* e *Dickeya*, outros gêneros como *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Rahnella* e *Raoutella* também estão associadas a podridão mole no estado de Pernambuco. Por meio da MLSA, 64 isolados foram identificados como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e 47 como *P. aroidearum*, demonstrando a prevalência dessas bactérias no estado. Observou-se elevada diversidade de gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae causando podridão mole em hortaliças nas diferentes zonas climáticas do estado de Pernambuco. A alface é a hortaliça mais suscetível ao ataque das enterobactérias, incluindo bactérias que são patogênicas ao homem. Foi realizado o primeiro registro da ocorrência de podridão mole causada por *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *D. dadantii* subsp. *dadantii* e *D. zea* em alface, *E. ludwigii*, *E. massiliensis* e *E. bugandensis* em abobrinha, *K. pneumoniae* subsp. *ozanae* em alface, *K. michiganensis* em alface e repolho, *M. morgani* subsp. *sibonii* em couve-chinesa, *R. inusitata* em coentro japonês, *R. terrigena* em abobora e alface, *L. amnigena* em abobrinha e *K. georgiana* em alface, berinjela e pimentão. A análise da população de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (n = 64) revelou uma alta variabilidade, elevada riqueza de haplótipos e alta diversidade genética da população. Entretanto, foram observadas evidências de baixo fluxo gênico entre as subpopulações da Zona da Mata, Agreste e Sertão. Foi observada ausência de recombinação nas subpopulações, indicando que possivelmente a mutação tem sido o fenômeno causador da variabilidade genética observada na população estudada. Não houve diferenciação genética entre as subpopulações e a análise de variância molecular demonstrou que grande parte da variação ocorreu dentro das subpopulações.

Palavras-chave: identificação, MLSA, genotipagem, diversidade genética, REP-PCR.

GENERAL ABSTRACT

The soft rot disease is responsible for causing significant losses in the production of several crops around the world. Our objectives were: i) to identify the bacteria causing soft rot in different vegetables from different climatic zones (forest, intermediary, semiarid) of the Pernambuco state by sequencing of the 16S rDNA region and multilocus sequence analysis (MLSA) with the genes *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA*, *gyrA*, *ropS*, *recA*, *dnaX*, *fusA* and *rplB*; (ii) to analyze the genetic structure of the population prevalent in the study (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*) using rep-PCR analysis. BLASTn analysis of the 16S rDNA region showed that the collection of 177 isolates, in addition to species and subspecies of *Pectobacterium* and *Dickeya*, other genera such as *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Rahnella* and *Raoutella* are also associated with soft rot in the state of Pernambuco. Through the MLSA, 64 isolates were identified as *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* and 47 as *P. aroidearum*, demonstrating the prevalence of these bacteria in the state. It was observed high diversity of genera and species of the family Enterobacteriaceae causing soft rot in vegetables in the different climatic zones of the state of Pernambuco. Lettuce is the most susceptible vegetable to the attack of enterobacteria, including bacteria that are pathogenic to man. The first record of the occurrence of soft rot caused by *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *D. dadantii* subsp. *dadantii* and *D. zae* in lettuce, *E. ludwigii*, *E. massiliensis* and *E. bugandensis* in zucchini, *K. pneumoniae* subsp. *ozone* in lettuce, *K. michiganensis* in lettuce and cabbage, *M. morgani* subsp. *sibonii* in Chinese cabbage, *R. inusitata* in Japanese coriander, *R. terrigena* in pumpkin and lettuce, *L. amnigena* in zucchini and *K. georgiana* in lettuce, eggplant and peppers. Population analysis of *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (n = 64) revealed high variability, high haplotype richness and high genetic diversity of the population. However, evidence of low gene flow was observed among the subpopulations of Zona da Mata, Agreste and Sertão. It was observed absence of recombination in the subpopulations, indicating that possibly the mutation has been the phenomenon that caused the genetic variability observed in the study population. There was no genetic differentiation between the subpopulations and the analysis of molecular variance showed that much of the variation occurred within the subpopulations.

Keys word: identification, MLSA, genotyping, genetic diversity, REP-PCR.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE PODRIDÃO MOLE EM HORTALIÇAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

INTRODUÇÃO GERAL

1. Importância das hortaliças

A produção de hortaliças é uma atividade agrícola extremamente importante no Brasil, destacando-se pelo fato de ser altamente intensiva, pois as culturas exigem mão de obra desde a semeadura até a comercialização, gerando empregos em toda cadeia produtiva (FILGUERIA, 2008). O setor é responsável por um PIB de mais de 6 bilhões de dólares e pela geração de cerca de 2 milhões de empregos, demonstrando que a olericultura é uma atividade altamente rentável e de grande importância para a economia do país (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA DO BRASIL, 2017).

No cenário nacional, as hortaliças são essenciais na alimentação diária, sendo produzidas centenas de espécies e variedades que asseguram sabor, cor, aroma e nutrição à mesa da população brasileira (CARVALHO et al., 2016). As principais hortaliças plantadas no país são alface alface (*Lactuca sativa* L.), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), abóbora (*Cucurbita moschata* Duch.), alho (*Allium sativum* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), beterraba (*Beta vulgaris* L.), cebola (*Allium cepa* L.), cenoura (*Daucus carota* L.), coentro (*Coriandrum sativum* L.), couve flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.), pimentão (*Capsicum annum* L.), tomate de mesa (*Solanum lycopersicum* L.) e tomate industrial (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA DO BRASIL, 2017).

A região sudeste (São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro), e região Sul (Paraná e Rio Grande do Sul) são as maiores produtoras e consumidoras de hortaliças do país. A região nordeste (Bahia, Ceará e Pernambuco) representa cerca de 5% da produção nacional, enquanto que a região centro-oeste (Goiás e o Distrito Federal) são responsáveis por 2% dessa produção (CARVALHO et al., 2016).

O estado de Pernambuco está subdividido nas mesorregiões da Zona da Mata, Agreste e Sertão, as quais apresentam características peculiares de clima, condições pluviométricas, tipo de solo e agricultura (CONAB, 2016).

A mesorregião da Zona da Mata caracteriza-se por apresentar umidade variando de 30 a 100%, com níveis de precipitação podendo ultrapassar 2500 mm por ano e temperaturas de 15 a 36°C (APAC, 2017). Nessa mesorregião, a bacia do rio Natuba possui fertilidade e

condições climáticas adequadas para a produção de hortaliças, caracterizando-se como o principal centro de produção de hortaliças folhosas do Nordeste, atendendo ao mercado da região metropolitana do Recife e distribuindo para outras regiões do estado (BRAGA 1998; MIRANDA; ARAÚJO; SAMPAIO, 2014).

Na mesorregião do Agreste, a umidade varia entre 10 e 100% e a precipitação varia de 300 a 1200 mm por ano, com temperaturas mais amenas, variando de 15 a 32°C (APAC, 2017). A produção de hortaliças é desenvolvida por agricultores familiares e tem como características principais o uso intensivo de mão de obra (VIEIRA, 2011). Nessa mesorregião, o município de Camocim de São Félix se destaca pelo cultivo de hortaliças utilizando irrigação, principalmente para hortaliças como tomate, repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) e pimentão (SILVA et al., 2001).

Na mesorregião do Sertão, a umidade varia entre 5 e 90% e a precipitação varia de 400 a 800 mm por ano, com temperatura variando de 15 a 41°C (APAC, 2017). Embora apresente condições semiáridas, o Sertão pernambucano consegue ser produtivo (CONAB, 2016). Essa mesorregião caracteriza-se pela produção de hortaliças de ciclo curto e os campos de produção localizam-se ao redor no município de Petrolina-PE (BARROSO, 2016).

As hortaliças, de um modo geral, são afetadas por diversas doenças causadas por bactérias que podem limitar o desenvolvimento da cultura. Algumas dessas bactérias estão presentes em diversos hospedeiros, como é o caso das espécies dos gêneros *Dickeya* e *Pectobacterium*, as quais são responsáveis por causar sintomas de podridão mole, talo oco e canela preta em seus hospedeiros (AREMU; BABALOLA, 2015; BERIAM, 2007).

2. Podridão mole

A podridão mole é uma doença de ocorrência comum no Brasil e no mundo, afetando as hortaliças desde o campo até a fase de pós-colheita (KUROZAWA; PAVAN, 1997). Apresentam grande importância econômica em couve-chinesa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*), alface, beterraba, couve comum, pimentão, repolho, tomate, entre outras. No estado de Pernambuco, em levantamento realizado em 2004 a podridão mole apresentou prevalência de 100% em cultivos de couve chinesa e 45,2% em alface (ALVARADO et al., 2011; SILVA, et al., 2007), confirmando esta importância.

A doença é causada por bactérias pectinolíticas pertencentes à família Enterobacteriaceae, é responsável por causar perdas significativas na produção de diversas culturas ao redor do mundo (DESS et al., 2017; LEE et al., 2015). Esse sintoma é resultante da

dissolução de células e tecidos da planta hospedeira por enzimas pectinolíticas (pectinases), a saber: pectato liase (Pel), pectina liase (Pnl), pectina metil esterase (Pme) e pectina acetil esterase (Pae), que são importantes fatores de patogenicidade dessas bactérias (DESS et al., 2017; KADO, 2010). Essas enzimas são produzidas e exportadas por bactérias que apresentam a capacidade de causar maceração do tecido vegetal, resultando em colapso total da planta (AREMU; BABALOLA, 2015; KADO, 2010; LEE, et al., 2015; MARIANO et al., 2005). Além das enzimas pectinolíticas, as bactérias causadoras de podridão mole também produzem celulases e proteases. Tanto as enzimas pectinolíticas quanto as celulases são secretadas pelo sistema de secreção do tipo II (SSTII), enquanto as proteases são secretadas pelo sistema de secreção do tipo I (SSTI) (HYTYIÄINEN, 2005; KADO, 2010). Coletivamente, estas enzimas fornecem oligômeros na forma de oligossacáridos, açúcares simples, peptídeos e aminoácidos simples que podem ser importados e consumidos pelas bactérias (KADO, 2010).

Os sintomas da podridão mole são pequenas lesões encharcadas que aumentam rapidamente e causam uma vasta maceração e apodrecimento do tecido parenquimatoso do órgão vegetal. Em alface e couve-chinesa, os sintomas ocorrem inicialmente na base da nervura das folhas que ficam em contato com o solo infestado. A maceração do tecido progride rapidamente para o caule principal, resultando no colapso de toda planta (REN et al., 2001). Em berinjelas, tomateiros e pimentões, a podridão mole pode ocorrer tanto nos frutos quanto no caule. Nos frutos, a doença ocorre na região do pedúnculo, sendo observadas depressões aquosas (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2012). Quando a penetração bacteriana ocorre por meio de ferimentos provocados por insetos (brocas e traças), o fruto apodrece e fica pendurado na planta, com o aspecto de uma pequena bolsa d'água (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997). Quando a doença ocorre no caule, os sintomas se iniciam nas bifurcações dos ramos, onde aparece um escurecimento externo. Ao pressionar a região escurecida, a mesma é facilmente esmagada devido à desidratação da medula, resultando no sintoma conhecido como "talo oco" (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997; AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2012). O talo oco e canela preta podem ocorrer ao mesmo tempo em batata, tomate e pimentão, bem como em outras solanáceas. O sintoma da canela preta é consequência da colonização da casca com produção e acúmulo de melanina e de outros pigmentos escuros na base do caule (ROMEIRO, 2005).

Frequentemente os tecidos apodrecidos atraem patógenos oportunistas que contribuem para a maceração do tecido, podendo produzir uma variedade de odores desagradáveis enquanto o patógeno primário continua sua invasão no tecido hospedeiro (BARRAS et al., 1994; KADO, 2010).

A podridão mole em hortaliças também ocorre na fase de pós-colheita, pois a bactéria penetra por ferimentos provocados durante as operações de colheita, embalagem e transporte (PEROBELON, 2002). Essa doença apresenta-se bastante importante em regiões onde são realizados plantios sucessivos, principalmente durante verões chuvosos e quentes, bem como em locais onde há irrigação excessiva em conjunto com ferimentos e nutrição desequilibrada das plantas, principalmente com excesso de nitrogênio (KIMATI et al., 2005; PEROMBELON, 1992). Em solos ácidos e em condições de elevada temperatura e umidade, a podridão mole também se comporta como um fator limitante, principalmente na fase final de cultivo das hortaliças (MARINGONI, 1997).

O manejo da podridão mole é difícil devido a elevada gama de hospedeiros, a capacidade de sobrevivência em restos de cultura no solo (REN et al., 2001) e a alta variabilidade genética das bactérias pectinolíticas (FÉLIX, 2012). Além disso, uma vez que os sintomas da doença se desenvolvem, não há métodos de controle disponíveis (MOTYKA et al., 2017).

Algumas medidas preventivas podem ser adotadas no manejo da doença, tais como utilizar sementes limpas e adequadamente tratadas, realizar o plantio em solos bem drenados ou em estufas com boa ventilação, utilizar água não contaminada, evitar a irrigação excessiva por aspersão, realizar rotações de cultura (preferencialmente com gramíneas durante no mínimo um ano), controlar as plantas daninhas, evitar ferimentos nas raízes durante o transplante, e realizar tratamento para o controle de nematoides e insetos do solo (MARIANO et al., 2005). Essas práticas culturais podem reduzir a incidência da doença, mas nem sempre são eficientes (PEROMBELON, 1992; REN et al., 2001).

3. Enterobacteriaceas causadoras de podridão mole

As bactérias causadoras de podridão mole pertencem ao domínio Bacteria, filo Proteobacteria (Cavalier; Smith, 2002), classe Gammaproteobacteria (Gariti; Bell; Lilburn, 2015), ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae (BRENNER; FARMER, 2015).

A ordem Enterobacteriales é grande e diversa, caracterizando-se por abrigar bactérias Gram-negativas, facultativamente anaeróbicas, não formadoras de esporos, em forma de bastonetes, com flagelos peritríquios. Os membros deste grupo habitam distintos nichos ecológicos e são comumente encontrados no solo, na água e em associação com organismos vivos, incluindo plantas, insetos, animais e seres humanos (BRENNER; FARMER, 2005). Nessa ordem destaca-se a família Enterobacteriaceae, a qual abriga 28 gêneros e 75 espécies

validamente publicadas (CROXEN e FINLAY, 2010; LIVERMORE, 2012; TZOUVELEKIS et al., 2012). Alguns gêneros dessa família são bem definidos, como *Salmonella* Lignieres, *Escherichia* Castellani e Chalmers, *Dickeya* Samson et al., *Pectobacterium* Waldee e *Brenneria* Hauben et al., (SAMSON et al., 2005; HAUBEN et al., 1998; MAES; HUVENNE; MESSENS, 2011; ADELOU et al., 2016) e várias espécies são patógenos de seres humanos e animais, como *Escherichia coli* (Migula) Castellani e Chalmers, *Salmonella enterica* (Kauffmann e Edwards) Le Minor e Popoff e *Yersinia pestis* (Lehmann e Neumann) van Loghem, bem como causam doenças devastadoras em plantas de importância econômica como *Dickeya dadantii* subsp. *dadantii* Samson et al., *D. solani* Van der wolf et al., *Pectobacterium carotovorum* Waldee, *P. atrosepticum* (van Hall 1902) Gardan et al., (MANSFIELD et al., 2012).

Os gêneros *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp. são responsáveis por causar perdas econômicas importantes em diferentes culturas, sendo conhecidas por apresentarem espécies que estão listadas entre as 10 bactérias fitopatogênicas mais destrutivas do mundo (MANSFIELD et al., 2012). As espécies desses gêneros foram inicialmente classificadas no gênero *Erwinia* Winslow et al., que por sua vez foi originalmente proposto por Winslow et al. (1917) para acolher bactérias fermentativas, com flagelos peritríquios, Gram negativas, que poderiam ser subdivididas em três grupos: *Amylovora* (espécies necrotróficas), *Carotovora* (espécies pectinolíticas causadoras de podridão mole) e *Herbicola* (isolados que apresentavam pigmentos amarelos, incluindo saprófitas). Em 1945, Waldee propôs a transferência das espécies pectinolíticas do grupo *Carotovora* para o gênero *Pectobacterium* Waldee (DYE, 1969; ROBBS, 1981). No entanto, essa proposta não foi aceita pelos fitobacteriologistas da época devido ao surgimento de espécies intermediárias entre *Erwinia* e *Pectobacterium* e pela descoberta de patógenos com características análogas às de *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Hauben et al. (MARIANO et al., 2005).

O reposicionamento das espécies de *Erwinia* foi realizado com base no sequenciamento da região 16S rDNA de 29 isolados representando espécies de *Erwinia*, *Pantoea* Gavini et al., e *Enterobacter* Hormaeche e Edwards, (HAUBEN et al., 1998). Os isolados foram separados em quatro grupos filogenéticos, sendo o primeiro grupo formado pelas “erwínias verdadeiras”: *Erwinia amylovora* (Burrill) Wislow et al., *E. mallotivora* Goto, *E. persicinus* Hao et al., *E. psidii* (Neto et al.), *E. rhapontici* (Millard) Burkholder e *E. tracheiphila* (Smith) Bergey et al.; o segundo grupo formado pelas “erwínias pectinolíticas”: *E. cacticida* Alcorn et al., *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye, *E. carotovora* subsp. *betavascularum* Thomson et al., *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al., *E. carotovora* subsp. *odorifera* (Gallois et al.), *E. carotovora* subsp. *wasabiae* Goto e Matsumoto, *E. chrysanthemi* Burkholder

et al. e *E. cypripedii* (Hori) Brenner et al., o terceiro grupo formado por *E. alni* Surico et al., *E. nigrifluens* Wilson et al., *E. paradisiaca* Fernandez-Borrero e Lopez-Duque, *E. quercina* Hildebrand e Schroth, *E. rubrifaciens* Wilson et al. e *E. salicis* (Day) Chester; e o quarto grupo formado por *E. stewarti* (Smith) Dye, *E. ananatis* (Serrano), *E. milletiae* (Kawakami e Yoshida) Magrou e *E. herbicola* (Lohnis). Ainda nesse estudo, as espécies pectinolíticas foram alocadas no gênero *Pectobacterium* Waldee, sendo classificadas como: *P. cacticidium* (Alcorn et al.) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (van Hall) Gardan et al., *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* (Thomson et al.) Gardan et al., *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (van Hall) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois et al.) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (Goto and Matsumoto) Hauben et al., *P. chrysanthemi* (Burkholder et al.) Brenner et al., e *P. cypripedii* (Hori) Brenner et al.

Uma segunda reclassificação foi proposta com base na análise de uma coleção de 42 isolados pertencentes às cinco subespécies de *P. carotovorum* (*atrosepticum*, *betavasculorum*, *carotovorum*, *odoriferum* e *wasabiae*) e onze isolados de *P. chrysanthemi*, *P. cacticidium* e *Brenneria paradisiaca* (Fernandez-Borrero e Lopez-Duque) Hauben et al., por meio de hibridização de DNA-DNA, características fenotípicas e sorológicas e análise filogenética da região 16S rDNA. Na ocasião foi proposta a elevação de *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. wasabiae* e *P. odoriferum* ao nível de espécie (GARDAN et al., 2003).

Atualmente o gênero *Pectobacterium*, abriga nove espécies: *P. aroidearum* (NABHAN et al., 2013), *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. wasabiae* (GARDAN et al., 2003), *P. cacticida* (HAUBEN et al., 1998), *P. parmentieri* (KHAYI et al., 2016), *P. carotovorum* com as subespécies: *P. carotovorum* subsp. *actinidiae* (KHO et al., 2012), *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (DUARTE et al., 2004), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (HAUBEN et al., 1998), *P. peruviense* (WARELON et al., 2017) e *P. polaris* (DESS et al., 2017).

A criação do gênero *Dickeya* Samson et al., foi proposta com base na análise de uma coleção de 75 isolados de *P. chrysanthemi*, incluindo biovares, patovares e isolados tipos de *B. paradisiaca* e *P. cypripedii* por meio de estudos de hibridização DNA-DNA, taxonomia numérica de características fenotípicas, técnicas sorológicas e análise filogenética da região do 16S rDNA. Nesse estudo foi concluído que *P. chrysanthemi* e *B. paradisiaca* formavam um grupo diferente do gênero *Pectobacterium* e *Brenneria*, sendo transferidas para o novo gênero *Dickeya* como as espécies *D. chrysanthemi* (Burkholder et al.) Samson et al., *D. dadantii* Samson et al., *D. dianthicola* Samson et al., *D. dieffenbachiae* Samson et al., *D. paradisiaca* (Fernandez-Borrero e Lopez-Duque) Samson et al., e *D. zaeae* Samson et al., (SAMSON et al.,

2005). Posteriormente, com base em estudos envolvendo o sequenciamento do gene 16S rDNA e análise de sequências multilocus (MLSA) com os genes *gyrB*, *rpoB*, *infB* e *atpD*, uma reclassificação adicional foi realizada, resultando na transferência de *D. dieffenbachiae* como subespécie de *D. dadantii* (BRADY et al., 2012). Em seguida, isolados obtidos de batatas na Europa foram inicialmente classificados como *Dickeya* spp. biovar 3 (SLAWIAK et al., 2009) foram reclassificados como *Dickeya solani* van der Wolf et al., (VAN DER WOLF et al., 2014). Além disso, outros três isolados do Reino Unido e Finlândia foram classificados como representantes de uma nova espécie: *Dickeya aquatica* (PARKINSON et al., 2014).

Atualmente o gênero *Dickeya* abriga oito espécies: *D. dadantii*, incluindo as subespécies *dadantii* e *dieffenbachiae* (SAMSON et al., 2005), *D. chrysanthemi* (BURKHOLDER et al., 1953), *D. solani* (VAN DER WOLF et al., 2014), *D. aquatica* (PARKINSON et al., 2014), *D. dianthicola* (SAMSON et al., 2005), *D. paradisiaca* (SAMSON et al., 2005), *D. zeae* (SAMSON et al., 2005) e, mais recentemente, *D. fangzhongdai* (Tian et al.), a qual foi relatada causando cancro em pereira (*Pyrus pyrifolia* Nakai) na China (TIAN et al., 2017).

O gênero *Enterobacter* é um dos maiores gêneros da Enterobacteriaceae e abriga espécies que vivem em quase todos os habitats e apresentam espécies que já foram relatadas como agentes causais de podridão em cebolinha e em rizoma de gengibre (WHANG et al., 2008; SCHROEDER, 2009; ZHU et al., 2011; MOREIRA et al., 2013). Esse gênero historicamente é bastante complexo e atualmente inclui 19 espécies, as quais foram reclassificadas pela análise de sequências multilocus e hibridização DNA-DNA (KUHNERT et al., 2009). Adicionalmente, outro gênero recentemente criado, *Lelliottia* Brady et al., também apresenta espécies que foram relatadas causando podridão mole em bulbos de cebola na China (LIU et al., 2016).

A taxonomia da família Enterobacteriaceae está longe de ser totalmente elucidada, uma vez que se trata de um grupo taxonômico confuso e complexo, com alta variabilidade, composto em sua maioria por bactérias que não apresentam especificidade de hospedeiro (AREMU; BABALOLA, 2015). Adicionalmente, outros estudos moleculares têm sido realizados para identificar e estudar a diversidade dessas bactérias (MA et al., 2007; MORETTI et al., 2016; NABHAN et al., 2012).

4. Técnicas moleculares utilizadas para classificação e identificação de bactérias

O sistema de classificação baseado em análises de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas criou dúvidas e confusão a respeito da posição taxonômica de muitas

fitobactérias (PRAKASH et al., 2007; GEVRES et al., 2005). Entretanto, devido o avanço da biotecnologia, o uso de técnicas moleculares possibilitou uma maior resolução das relações entre esses micro-organismos (GLAESER e KAMPFER, 2015). Nesse sentido, a taxonomia bacteriana tem sido realizada por meio de um conjunto de técnicas como análises da sequência da região 16S do rDNA, estudos de hibridação DNA-DNA e técnicas integradas com vários marcadores moleculares (PRAKASH et al., 2007).

A região 16S rDNA tem sido bastante utilizada como marcador universal para análise evolutiva básica de bactérias cultiváveis e não cultiváveis, por ocorrer de forma ubíqua em Bacteria e Archaea e por apresentar função indispensável na síntese proteica (GLAESER e KÄMPFER, 2015). Ao longo dos anos, essa ferramenta tornou-se padrão para determinar relações filogenéticas entre espécies bacterianas, incluindo as bactérias da família Enterobacteriaceae (HAUBEN et al., 1998; GARDAN et al., 2003; SAMSON et al., 2005; MASHAVHA, 2013). Além disso, devido ao aumento no número de sequências da região 16S rDNA disponíveis em bancos de dados públicos, a identificação de diversas fitobactérias ficou mais acessível (HAUBEN et al., 1998).

A atual compreensão da filogenia dos membros da ordem Enterobacteriales é baseada principalmente no gene 16S rRNA (Fracino et al. 2006; Hauben et al. 1998; Naum et al. 2008), que é uma técnica muito sensível para detecção e discriminação de vários gêneros e algumas espécies, pois possui como vantagens ser um gene de cópia única, altamente conservado e de fácil amplificação (MA et al., 2007).

Estudos realizados a partir do sequenciamento da região 16S rDNA possibilitaram a identificação de diversos grupos taxonômicos, como na Korea, quando 149 isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* provenientes de diversas hortaliças foram identificados por meio de sequenciamentos dessa região e do gene *recA* (LEE et al., 2014). Em outro estudo, as relações filogenéticas entre os grupos de *Erwinia amylovora*, *P. betavascularum*, *P. carotovorum*, *P. wasabiae*, *Dickeya* spp., *E. coli*, *Pantoea agglomerans* (Ewing e Fife) Gavini et al. e *Proteus vulgaris* (Hauser) (foram inferidas a partir do gene 16S rDNA, o qual foi capaz de separar as bactérias da família Enterobacteriaceae causadoras de podridão mole em único clado, separando-as das patogênicas a humanos e animais (KWON et al., 1997).

Apesar de ser uma ferramenta frequentemente utilizada em estudos filogenéticos dos principais gêneros da família Enterobacteriaceae, a região 16S rDNA apresenta baixo poder de resolução para discriminação de organismos estreitamente relacionados (NABHAN, et al., 2012), como é o caso das enterobactérias. Nesse sentido, árvores filogenéticas baseadas nas

sequências dessa região mostraram que alguns gêneros da família Enterobacteriaceae apresentam-se fortemente relacionados e são polifiléticos (ALNAJAR; GUPTA, 2017).

A investigação de relacionamentos filogenéticos entre organismos relacionados pode ser realizada por meio de análises de genes que codificam proteínas, os quais devem apresentar uma taxa de evolução lenta, mas constante (GLAESER; KÄMPFER, 2015). Nesse sentido, uma abordagem mais robusta e com maior poder de resolução na identificação e diferenciação de isolados de bactérias é a análise de sequências multilocus (MLSA). A técnica baseia-se na análise das sequências de nucleotídeos de vários genes conservados e essenciais para a manutenção de funções celulares básicas encontradas em qualquer organismo, denominados genes *housekeeping* (ALMEIDA et al., 2010).

Na MLSA as sequências são comparadas por similaridade e, em adição, as análises filogenéticas são realizadas com bases em matrizes de similaridade ou diretamente a partir da sequência. Assim, a técnica de MLSA é mais adequada do que a região 16S rDNA para separação de espécies e subespécie bacterianas (PITMAN et al., 2010; NABHAN et al., 2011).

A MLSA tornou-se uma ferramenta rápida e poderosa, frequentemente utilizada para inferir relações filogenéticas a níveis intra e interespecífico de bactérias estreitamente relacionadas (BRADY et al., 2008; LAI et al., 2014; MAIDEN, 2006). Além disso, essa técnica tem se mostrado um método rápido e eficaz em estudos de filogenia e taxonomia de diversas bactérias, entre elas as bactérias pectinolíticas (GLAESER; KÄMPFER, 2015; MA et al., 2007).

Diversos genes *housekeeping* tem sido utilizados em MLSA para análise de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, tais como *gyrA* (subunidade alfa da DNA girase), *gyrB* (subunidade beta da DNA girase), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), *rpoD* (fator sigma da RNA polimerase), *atpD* (subunidade da ATP sintase), *infB* (fator de iniciação da tradução IF-2), *recA* (recombinase alfa), *mdh* (malato desidrogenase), *proA* (gama-glutamil fosfato redutase), *gapA* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase subunidade alfa), *icdA* (isocitrato desidrogenase, específico para NADP⁺), *mtlD* (mannitol-1-fosfato desidrogenase), *pgi* (glucose-6-fosfato isomerase), *fusA* (fator de alongação G), *rplB* (50S ribossomal subunidade L2), *dnaX* (DNA polimerase III subunidade tau e gama), *rpoS* (RNA polimerase, fator sigma S - sigma 38), *dnaN* (DNA polimerase III, subunidade beta), *purA* (adenilosuccinato sintetase), os quais estão presentes em todos os membros dessa família (BRADY et al., 2008; MA et al., 2007; NABHAN et al., 2011; VAN DER WOLF, et al., 2014).

A MLSA tem se caracterizado como uma importante ferramenta para inferir o relacionamento genético dentro dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. A recomendação é que

o número mínimo de cinco genes *housekeeping* seja utilizado para superar qualquer divergência filogenética (ROSELLÓ-MÓRA e AMANN, 2015). Nesse sentido, os genes mais utilizados são *acnA*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *mtlD*, *pgi* e *proA* (MA et al., 2007; NABHAN, et al., 2012; WARELON, et al., 2013). Adicionalmente, análises realizadas com esses genes demonstraram que os gêneros *Dickeya* e *Brenneria* são mais diversificados do que o gênero *Pectobacterium* (MA et al., 2007).

5. Estrutura genética de populações

Define-se como estrutura genética a quantidade e distribuição da variação existente entre e dentro das populações, sendo resultante da interação entre as forças evolutivas mutação, migração, seleção, deriva e recombinação (MCDONALD; LINDE, 2002; NEI, 1973).

A evolução está relacionada às mudanças na frequência alélica ou genotípicas em populações, em escalas de tempo relativamente curtas (MILGROOM, 2015). Logo, o conhecimento sobre a estrutura genética dá uma visão dos processos evolutivos que moldaram uma população no passado, oferecendo o conhecimento sobre o potencial evolutivo dessa população (MILGROOM, 2015). Por sua vez, o conhecimento sobre o potencial evolutivo de um patógeno pode ser útil para aprimorar o uso de genes de resistência, fungicidas e antibióticos, minimizando as perdas que resultam na redução de eficácia destes métodos de controle (MCDONALD; LINDE, 2002).

Para avaliar a estrutura populacional de fitopatógenos, diversos marcadores genéticos podem ser utilizados, como rep-PCR, sequências simples repetitivas (SSR), sequências de nucleotídeos e isoenzimas, fornecem informações que possibilitam a avaliação da estrutura populacional de fitopatógenos (LEHNER, 2011).

A técnica de rep-PCR tem sido utilizada amplamente para caracterizar a diversidade genética, identificar isolados e em estudos de taxonomia (TRAVASOLI; MAREFA; HASSANZADEH, 2011; LEE, et al., 2014). Trata-se de uma ferramenta poderosa capaz de analisar genomas bacterianos e avaliar a diversidade de espécies e subespécies (LOUWS et al., 1999). Adicionalmente, a técnica de rep-PCR tem sido comumente utilizada em estudos de diversidade genética de diversas bactérias, caracterizando-se como sendo de fácil execução e de elevado poder de resolução (CZAJKOWSKI et al., 2015). Nessa técnica, *primers* correspondentes a sequências de DNA pertencentes a elementos altamente conservados, repetitivos e intercalados no genoma bacteriano são utilizados para amplificação por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os elementos repetitivos são chamados de elementos

BOX (Box elements - BOX), sequências extragênicas palindrômicas repetitivas (sequence repetitive extragenic palindromic – REP) e sequências repetitivas intergênicas consenso de enterobactérias (enterobacterial repetitive intergenic consensus - ERIC) e a técnica que emprega esses marcadores em conjunto é chamada de rep-PCR (LOUWS et al, 1994; LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999; VERSALOVIC et al., 1994). Essa técnica tem se mostrado bastante confiável, reproduzível e altamente discriminatória em estudos de diversidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (DANA, KHODAKARAMIAN, ROUHRAZI, 2015).

No estudo de estrutura genética, geralmente um levantamento da diversidade genética em várias populações da espécie é realizado por meio de um conjunto de marcadores moleculares. Esses marcadores devem ser capazes de mostrar como a variabilidade está distribuída entre as populações, permitindo que inferências quanto aos padrões de cruzamentos e dispersão, fluxo gênico e histórico biogeográfico da espécie sejam realizados (SCHANABEL e AMAUD, 1998).

Em estudos de populações de microrganismos faz-se necessário o emprego de índices de diversidade gênica e genotípica para estimar a diversidade genética (GRÜNWARD et al. 2003). A diversidade genotípica refere-se ao número e a frequência dos genótipos ou indivíduos geneticamente distintos em uma população, enquanto a diversidade gênica refere-se ao número e frequência de alelos em *locos* individuais numa população (MCDONALD; LINDE, 2002).

De um modo geral, os marcadores moleculares podem ser utilizados para descrever a variabilidade genética de uma população por meio de índices de diversidade genética total (Ht); riqueza genotípica $E(gn)$ inferida por meio de curvas de rarefação (Grunwald et al. 2003); o número de haplótipos, o índice de Simpson (Lambda) (HE e HU, 2005) e índice de Shannon-Wiener. Além disso, os marcadores também permitem a realização de várias análises da estrutura populacional por meio do cálculo da diferença genética interpopulacional (Fst), índices de associação (I_A), índice de associação alternativo r_{barD} (r_d), análise discriminante de componentes principais (DAPC) (Jombart et al., 2010) e análise da variância molecular (AMOVA).

O índice de diversidade gênica evidencia a distribuição da variabilidade genética dentro de populações subdivididas (NEI, 1973), enquanto o índice de equitabilidade $E(gn)$ infere como os genótipos estão distribuídos nas populações. O desequilíbrio de ligação ou equilíbrio gamético pode ser testado pelo índice de associação I_A (SMITH et al., 1993) e caracteriza-se como uma medida tradicional que calcula a distância entre todos os pares de indivíduos da população, ou seja, o número de *locos* em que eles diferem, comparando a variância dessas

distâncias com àquelas esperadas se não houvesse desequilíbrio gamético entre os pares de *locos*. O desequilíbrio gamético também pode ser estimado pelo índice de associação alternativo r_{barD} (r_d), que é menos sensível à variação no número de *locos*, facilitando a comparações entre populações. Adicionalmente, valores de I_A ou r_{barD} significativamente diferentes de zero indicam que a população está em desequilíbrio de ligação (AGAPOW; BURT, 2001).

A análise da estrutura genética é estimada por meio do F_{ST} ou pela AMOVA, pois ambos geram resultados semelhantes (NYBOM; BARTISH, 2000). O índice F_{ST} é um coeficiente que determina a diversidade relativa entre as subpopulações em relação à variância genética total da população (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013), enquanto a AMOVA quantifica a diferenciação genética entre e dentro das populações, gerando estimativas dos componentes de variância que refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica (EXCOFFIER et al., 2005).

A análise discriminante de componentes principais (DAPC) é um método multivariado utilizado para identificar e descrever grupos de indivíduos geneticamente relacionados. É uma análise que permite caracterizar as populações subdivididas e visualizar as diferenças entre as mesmas, além de evidenciar a contribuição de alelos individuais para a estruturação da população (JOMBART et al., 2010).

O conhecimento sobre a diversidade dos fitopatógenos tem aplicação direta na agricultura e na compreensão das relações fitopatógeno-hospedeiro, uma vez que a composição genética e a diversidade populacional desses fitopatógenos afeta diretamente o manejo das doenças (MILGROOM, 2015). Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante, pois determina o potencial de adaptação do organismo às diferentes condições que o mesmo se encontra (MCDONALD; LINDE, 2002). Nesse sentido, as estratégias de manejo de doenças de plantas são dependentes da compreensão de fatores do fitopatógeno e de sua dinâmica populacional, uma vez que esses fatores revelam como as populações desenvolvem respostas a diferentes estratégias de controle, pois fitopatógenos com maior diversidade genética apresentam um maior risco de suplantarem genes de resistência (ALFONSO, et al., 2000; MCDONALD e LINDE, 2002).

Apesar da importância da podridão mole para a olericultura em Pernambuco, não existem estudos sobre a diversidade e variabilidade de populações de bactérias pectinolíticas no estado. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivos: (i) identificar as bactérias causadoras de podridão mole em diferentes hortaliças no estado de Pernambuco por meio da

região 16S rDNA e MLSA; e (ii) analisar a estrutura genética da população prevalente no estudo (*P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*) por meio da técnica de rep-PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NAUSHAD, S.; GUPTA, R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 66, p. 5575–5599, 2016.

AGAPOW, P. M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1, p. 101-102, 2001.

ALATALO, R. V. Problems in the measurement of evenness in Ecology. **Oikos**, Copenhagen, v. 37, n. 2, p. 199-204, 1981.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G.; AITKEN, S. N. **Conservation and the genetics of populations**. 2^aed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2013. 663 p.

ALFONSO, C. R.; RAPOSO, R. E.; MELGAREJO, P. Genetic diversity in diversity in Botrytis cinerea populatios on vegetable crops in greenhouses in South-Eastern Spain, **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, p. 243-251, 2000.

ALMEIDA, N.F.; YAN, S.C.; CAI, R. M.; CLARKE, C. R.; MORRIS, C. E.; SCHAAD, N. W.; SCHUENZEL, E. L.; LACY, G. H.; SUN, X. A.; JONES, J.B.; CASTILLO, J. A.; BULL C. T.; LEMAN, S.; GUTTMAN, D. S.; SETUBAL, J. C.; VINATZER, B. A. A multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated Microbes, **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, p. 208-215, 2010.

ALVARADO, I.C.M.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R.L.R.; SOUZA, E.B.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; RESENDE, L. V.; CARDOSO, E.; MIZUBUTI, E.S.G. Characterization and variability of soft rot-causing bacteria in Chinese cabbage in north eastern Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Piza, v. 93, n. 1, p. 173-181, 2011.

ALNAJAR S.; GUPTA, R. Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family *Enterobacteriaceae* and support the reclassification of several polyphyletic members of the Family. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 54, p. 108-127, 2017.

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. Princípios e conceitos. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2012. v. 1, p. 207-226.

APAC - Agência Pernambucana de Águas e Climas. Sistema de Geoinformação Hidrometeorológico de Pernambuco. Disponível em: <http://www.apac.pe.gov.br>. Acesso em 2 de fevereiro, 2017.

AREMU, B. R.; BABALOLA, O. O. Classification and taxonomy of vegetable macergens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-11, 2015.

BARRAS, F., F. VAN GIJSEGEM, AND A.K. CHATTERJEE. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft rot *Erwinia*. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 210–234, 1994.

BARROSO, K. A. **Levantamento de doenças foliares em hortas urbanas de Petrolina-PE**. 2016, 38 f. (Trabalho de conclusão de curso) – Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina-PE.

BERIAM, L. O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. **Palestra**. Instituto Biológico, São Paulo, v. 69, n.2, p. 81-84, 2007.

BRADY, C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S.; COUTINHO, T.; DE VOS, P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb.

nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 36, p. 309–319, 2013.

BRADY, C. L., CLEENWERCK, I., DENMAN, S., VENTER, S. N., RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., COUTINHO, T. A.; DE VOS, P. 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 Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, p.1592–1602, 2012.

BRADY, C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S.N.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; COUTINHO, T.A. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA), **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 31, p. 447-460, 2008.

BRADY, C. L.; VENTER, S. N.; CLEENWERCK, I.; ENGELBEEN, K.; VANCANNEYT, M., SWINGS, J.; COUTINHO, T. A. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p. 2339-2345, 2009.

BRAGA, R. A. P. Gerenciamento Ambiental da Bacia do Tapacurá: sub – Bacia do Rio Natuba. **Artigo**. GRH – DECIV – UFPE, Recife, PE, 1998.

BRENNER, D. J.; FARMER III, J. J. Family I. **Enterobacteriaceae**. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd, vol. 2, p. 587–607. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity, D. R. Boone, P. Vos, M. Goodfellow, F. A. Rainey & K.-H. Schleifer. New York, NY: Springer, 2005.

BRENNER, D. J. AND FARMER, J. Enterobacteriaceae. In **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 3rd edn, vol. 8, p. 1–24, 2015. DOI: 10.1002/9781118960608.fbm00222, 2015.

BURKHOLDER, W.; MACFADDEN L, H.; DIMOCK A. A bacterial blight of *Chrysanthemums*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 43, n. 4, p. 522–525, 1953.

CARVALHO, C. et al. **Anuário brasileiro de hortaliças 2017**, Santa Cruz, Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 56p. ISSN 2178-0897.

CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading v. 52, p. 7-76, 2002.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUARIA DO BRASIL (CNA).

Mapeamento e qualificação da cadeia produtiva das hortaliças do Brasil. Brasília: CNA, 2017. ISBN: 978-85-87331-59-5, 79p. Disponível em:

http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/mapeamento_e_quantificacao_da_cadeia_de_hortalicas.pdf.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Conjuntura de produtos agropecuários de Pernambuco. 2016. Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_16_14_19_58_conjuntura_agropecuaria_de_pernambuco_2016.pdf. Acesso em 23 de jan. 2018.

CROXEN M. A.; FINLAY B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 26–38, 2010.

CZAJKOWSKI, R.; PÉROMBELON, M.C.M.; JAFRA, S.; LOJKOWSKA, E.; POTRYKUS, M.; VAN DER WOLF, J.M.; SLEDZ, W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. **Annals of Applied Biology**, London, v. 166, p. 18-38, 2015.

DANA, H.; KHODAKARAMIAN, G.; ROUHRAZI, K. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing watermelon soft rot disease in Iran. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 163 n. 9 p. 703-710, 2015.

DAUGA, C. Evolution of the *gyrB* gene the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 531–547, 2003.

DE BOER, S. H.; RUBIO, I. Blackleg of potato. **The Plant Health Instructor**. DOI:10.1094/PHI-I-2004-0712-01, 2004.

- DEES, M. W.; LEBECKA, R.; PERMINOW, J. I. S.; CZAJKOWSKI, R.; GRUPA, A.; MOTYKA, A.; ZOLEDOWSKA, S.; ŚLIWKA, J. LOJKOWSKA, E.; BRURBERG, M. B. Characterization of *Dickeya* and *Pectobacterium* strains obtained from diseased potato plants in different climatic conditions of Norway and Poland. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 148, p. 839-851, 2017.
- DESS, M. W.; LYSOE, E.; ROSSMANN, S.; PERMINOW, J.; BRURBERG, M. B. *Pectobacterium* *Polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 67, p. 5222-5229, 2017.
- 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.
- DUARTE, V.; DE BOER, S.H.; WARD, L.J; OLIVEIRA, A.M.R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n.2, p. 535-545, 2004.
- EE, R.; MADHAIYAN, M.; JI, L.; LIM, Y. L.; NOR, N. M.; TEE, K. K.; CHEN, J. W.; YIN, W. F. *Chania multitudinisentens* gen. nov., sp. nov., an Nacyl-homoserine-lactone-producing bacterium in the family Enterobacteriaceae isolated from landfill site soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 66, p. 2297–2304, 2016.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47–50, 2005.
- FAQUIHI, H.; TERTA, M.; AMDAN, M.; ACHBANI, EH. ENNAJI, M.; MHAND, R. A. Phenotypic and genotypic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot disease of potatoes in Morocco. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 143, p. 801–811, 2015.
- FÉLIX, K. C. S. **Manejo da podridão mole em couve-chinesa e alface**. 2012, 83 f. (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

FILGUEIRA, F. A. R. Asteraceas: alface e outras folhosas. In: FILGUEIRA, F. A. R. (ed.) Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna para produção de hortaliças. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. p. 300- 306.

FRANCINO, M. P.; SANTOS, S. R.; OCHMAN, H. Phylogenetic relationships of bacteria with special reference to endosymbionts and enteric species. In **The Prokaryotes**, p. 41–59, Springer, New York, 2006.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. *Gammaproteobacteria* class. nov. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 1. 2015.

GARDAN, L.; GOUY, C.; CHRISTEN, R.; SAMSON, R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 381–391, 2003.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v.38, n. 4, p. 237–245, 2015.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. Academic Press, San Diego, 1992.

GRÜNWARD, N. J.; GOODWIN S. B.; MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p.738-746, 2003.

HAUBEN, L.; MOORE, E.R.B.; VAUTERIN, L.; STEENACKERS, M.; MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; SWING, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, n.1, p. 384-397, 1998.

HASSAN, S. A.; ALTALHI, A. D.; GHERBAWY, Y. A.; EL- DEEB, B. A. Bacterial load of fresh vegetables and their resistance to the currently used antibiotics in Saudi Arabia, **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 8, n. 9, p. 1011–1018, 2011.

HATA, H.; NATORI, T.; MIZUNO, T.; KANAZAWA, I.; ELDESOUKY, I.; HAYASHI, M.; MIYATA, M.; FUKUNAGA, H.; OHJI, S.; HOSOYAMA, A.; AONO, E.; YAMAZOE A.; TSUCHIKANE, K.; FUJITA, N.; EZAKI, T. Phylogenetics of family Enterobacteriaceae and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 60, p. 303–311, 2016.

HYTTIÄINEN, H. Regulatory networks controlling virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. 2005. 57f. Tese (Mestrado) – Faculty of Biosciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2005.

JOMBART T.; DEVILLARD S.; BALLOUX F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, London, v.11, n. 94, p.1-15, 2010.

KADO, C. I. **Plant Bacteriology**. Saint Paul: APS, 2010. 336 p.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L.E.A. (Eds). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 663.

KHAYI, S.; CIGNA, J.; CHONG, T. M.; QUÊTU-LAURENT, A.; CHAN, K. G.; HÉLIAS, V.; FAURE, D. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 66, p. 5379-5383, 2016.

KHO, Y. J.; KIM, G. H.; LEE, S. H.; SOHN, S. H.; KOH, S.; KWON, S. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* subsp. nov., a new bacterial pathogen causing canker-like symptoms in yellow kiwifruit, *Actinidia chinensis*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 40, n.4, 2012.

KUHNERT, P.; KORCZAK, B. M.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H.; IVERSEN C. Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence

analysis (MLSA). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 152-8, 2009.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. **Doenças das solanáceas**, In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (Eds.). Manual de Fitopatologia. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 665-675.

KWON, S.W., GO, S.J., KANG, H.W., RYU, J.C. & JO, J.K. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequence. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 1061-1067, 1997.

LAI, Q.; LIU, Y.; YUAN, J.; DU, J., LIPING, W., SUN, F.; SHAO, Z. Multilocus sequence analysis for assessment of phylogenetic diversity and biogeography in *Thalassospira* bacteria from diverse marine environments. **PLoS one**, San Francisco, v.9, n.9, 2014.

LEE, D. H.; KIM, J.-B.; LIM, J.-A.; HAN, S.-W.; HEU, S. Genetic Diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* isolated in Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 30, n. 2, p.117–124, 2014. Doi: 10.5423/PPJ.OA.12.2013.0117

LEE, D. H.; LIM, J. A.; LEE, J.; ROH, E.; JUNG, K.; CHOI, K. SANGRYEOL RYU, C.O.H.S.; YUN, J.; HEU, S. Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage, **Microbiology**, v. 159, p. 1487–1496, 2015.

LEHNER, M. S. **Estrutura genética da população de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoads de Minas Gerais**. 2011, 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

LIVERMORE D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. **Korean Journal of Internal Medicine**, Seoul, v. 27, p. 128–142, 2012.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa –CNPH: Embrapa – SPI, 1997. 70 p.

LOUWS F., FULBRIGHT D.W., STEPHENS C.T., BRUIJN F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequence and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v, 60, n.7 p. 2286-2295, 1994.

LOUWS F.J., RADEMAKER J.L.W., DE BRUIJN F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

LIU, S.; TANG, S.; WANG, D.; LIN, N.; ZHOU, J. Identification and characterization of a new enterobacter onion bulb decay caused by *Lelliottia amnigena* in China. **Applied Microbiology Open Access**, v, 2, i.2, 2016. doi:10.4172/2471-9315.1000114

MA, B., HIBBING M. E.; KIM, H. S.; RENDY, M. R; YEDIDIA, I.; BREUER, J.; BREUER, J.; GLASNER, J. D.; PERNA, N. T.; KELMAN, A.; CHARKOWSKI, A. O. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n.9, p. 1150–63, 2007.

MAES M.; HUVENNE H.; MESSENS E. *Brenneria salicis*, the bacterium causing watermark disease in willow, resides as an endophyte in wood. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 1453–1462, 2011.

MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 60, p. 561-588, 2006.

MANSFIELD J.; GENIN S.; MAGORI S. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, p. 614–629, 2012.

MARINGONI, A.C. Doenças das crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, couve-flor, rabanete, repolho e rúcula). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A; REZENDE, J.A.M. (Eds.). In. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 315-324.

MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. (Eds.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2016. p. 37-49.

MARIANO, R. L. M.; SILVEIRA, E. B.; ALVARADO, I. C. M.; SILVA, A. M. F. Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 2, p. 121-153, 2005.

- MASHAVHA, MPHARISENI LEONARD. **Characterisation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* isolates causing blackleg and soft rot diseases of potato in South Africa**. 2013, 94 f. Master Scientae (Biotechnology) - University of Pretoria, Pretoria.
- MAYNARD SMITH, J.; SMITH, N.H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B.G. How clonal are bacteria? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 90, n. 10, p. 4384-4388, 1993.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 349-379, 2002.
- MILGROOM, M. G. **Population Biology of Plant Pathogens: genetics, ecology and evolution**. American Phytopathological Society Press, St. Paul, 2015. 399p.
- MIRANDA, E. C.; ARAÚJO, M. S. B.; SAMPAIO, E. V. S. B. Comparação das condições socioeconômicas de assentados na Zona da Mata de Pernambuco, praticando horticultura em sistemas orgânico e convencional. **Gaia Scientia**, Paraíba, v. 8, n. 1, p. 204-214, 2014.
- MORETTI, C.; FAKHR, R.; CORTESE, C.; DE VOS, P.; CERRI, M.; GEAGEA, L.; CLEENWERCK, I.; BUONAURIO, R. *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* as causal agentes of potato soft rot in Lebanon, **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 1, p. 205-211, 2016.
- MOTYKA, A.; ZOLEDOWSKA, S.; SLEDZ, W.; LOJKOWSKA, E. Molecular methods as tools to control plant diseases caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* spp: a minireview. **New Biotechnology**, 2017. Disponível em : <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.08.010>.
- MOREIRA, S.; DUTRA, D. C.; RODRIGUES, A. C.; OLIVEIRA, J. R.; DHIGRA, O. D.; PREIRA, O. L. Fungi and bacteria associated with post-harvest rot of ginger rhizomes in Espírito Santo, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 218-226, 2013.
- NABHAN, S., WYDRA, K., LINDE, M. AND DEBENER, T. 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.

NABHAN S.; WYDRAB, K.; LINDEC, M.; DEBENER, T. 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, 2012.

NABHAN, S.; DE BOER, S. H.; MAISS, E.; WYDRA, K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, p. 2520–2525, 2013.

NAUM, M.; BROWN, E. W.; MASON-GAMER, R. J. Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the enterobacteriaceae, **Journal Molecular Evolutionary**, v. 66, p. 630–642, 2008.

NAUM, M.; BROWN, E. W.; MASON-GAMER, R.J. Is a robust phylogeny of the enterobacterial plant pathogens attainable ?, **Cladistics**, v. 27, p. 80-93, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00313.x>

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NHUNG, P. H.; OHKUSUA, K.; MISHIMAB, N.; NODAA, M.; SHAHA, M. M.; SUNA, X.; HAYASHIA, M.; EZAKIA, T. Phylogeny and species identification of the Enterobacteriaceae based on dnaJ sequences. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 58, p. 153-161, 2007.

NYBOM, H.; BARTISH, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Jena, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

PARADIS, S.; BOISSINOT, M.; PAQUETTE, N.; BE LANGER, S. D.; MARTEL, E. A.; BOUDREAU, D. K.; PICARD, F. J.; OUELLETTE, M.; ROY, P. H.; BERGERON, M. G. Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase β -subunit. **International Journal of Systematic of Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 2013–2025, 2005.

PARKINSON N, DEVOS P, PIRHONEN M, ELPHINSTONE J. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. **International Journal of Systematic of Evolutionary Microbiology**, Reading, v.64, p.2264–6, 2014.

PÉROMBELOM, M.C.M. Potato blackleg: Epidemiology, host-pathogen interaction and control. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 98, p. 135-146, 1992.

PÉROMBELOM, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of pathogenesis. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, 1-12. 2002.

PITMAN, A.R., HARROW, S.A., VISNOVSKY S.B. Genetic characterization of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in new zealand. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 126, p. 423–435, 2010.

PRAKASH, O.; VERMA, M.; SHARMA, P.; KUMAR, M.; KUMARI, K.; SINGH, A.; KUMARI, A.; JIT, S.; GUPTA, S. K.; KHANNA, M.; LAL, R. Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. **Indian Journal Microbiology**, New Delly, v. 47, n.2, p. 97-108, 2007.

REN, J.; PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Genetics and population improvement resistance to bacterial soft rot Chinese cabbage. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 3, p. 197-207, 2001.

ROBBS, C.F. Taxonomia, bio-ecologia e principais representantes do gênero *Erwinia* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 304-305, 1981.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2ª ed. Viçosa: Imprensa Universitária. 2005. 417 p.

ROSELLÓ-MÓRA, R.; AMANN, R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 38, n. 4, p. 209-216, 2015.

SAMSON, R.; LEGENDRE, J. B.; CHRISTEN, R.; ACHUAK, W.; GARDEN, L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Brenner et. al. 1973) and *Brenneria paradisiaca* (Hauben et. al., 1998) to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. Nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. Nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1415-1427, 2005.

SCHANABEL, A. S.; AMAUD, P. B. A guide to software packages for data analysis in molecular ecology, **Advances in Molecular Ecology**, v. 306, 1998, 291 p.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. University of Illinois Press, Urbana, IL, 1949.

SILVA, A. B.; REZENDE, S. B.; SOUSA, A. R.; RESENDE, M.; FERRAZ, L. G. B. Principais características do sistema de produção de hortaliças no município de Camocim de São Félix, Pernambuco, **Boletim de pesquisa**, n. 05, 2001.

SILVA, A.M.F., MARIANO R.L.R., MICHEREFF S.J., SILVEIRA E.B., MEDEIROS F.H.V., Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface e couve-chinesa em Pernambuco. **Caatinga**, Mossoró, v. 20, p. 84-93, 2007.

SCHROEDER, B. K.; DU TOIT, L. J.; SCHWATZ, H. F. First Report of *Enterobacter cloacae* Causing Onion Bulb Rot in the Columbia Basin of Washington State, **Plant Disease**, Saint Paul, v. 3, n. 3, p. 323.

SLAWIAK, M.; VAN BECKHOVEN J.R.C.M.; SPEKSNIJDER A.G.C.L.; CZAJKOWSKI R.; GRABE G.; VAN DERWOLF J.M. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, p. 245–61, 2009.

SMITH M.J.; SMITH, N.H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B.G. How clonal are bacteria?. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p.4384-4388. 1993.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics**, Madison, v. 118, p. 705-711, 1988.

TIAN, Y.; ZHAO, Y.; YUAN, X.; YI, J.; FAN, J.; XU, Z.; HU, B.; DE BOER, H.; LI, X. *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 66, p. 2831-2835, 2017.

TOTH, I. K.; BELL, K. S.; HOLEVA, M. C.; BIRCH, P.R.J. Soft rot *Erwiniae*: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 17–30, 2003.

TAVASOLI, E.; MAREFAT, A. R.; HASSANZADEH, N. Identity and genetic diversity of *Pectobacterium* spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran. **African Journal of Plant Science**, v. 5, n. 6, p. 329-336, 2011.

- TZOUVELEKIS, L.S.; MARKOGIANNAKIS, A.; PSICHOGIOU, M.; TASSIOS, P.T.; DAIKOS, G.L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 25, p. 682-707, 2012.
- VAN DER WOLF, J. M.; NIJHUIS, E. H.; KOWALEWSKA, M. J.; SADDLER, G. S.; PARKINSON, N.; ELPHINSTONE, J. G.; PRITCHARD, L.; TOTH, I. K.; LOJKOWSKA, E.; POTRYKUS, M.; WARELON, M.; VOS, P.; CLEENWERCK, I.; PIRHONEN, M.; GARLAN, L.; HÉLIAS, V.; POTHIER, J. F.; PFLÜGER, V.; DUFFY, B.; TSROR, L.; MANULIS, S. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, p. 768-774, 2014.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VIEIRA, L. P. **Acumulação de nutrientes e metais pesado em solo, água, e hortaliças em áreas cultivadas com olerícolas no Agreste pernambucano**. Tese. 2011, 114f (Mestrado em ciência do solo-UFRPE).
- WALDEE, E. L. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. **Iowa State College Journal of Science**, Iowa, v. 19, p. 435-484, 1945.
- WARELON, M.; WALERON, M.; LOJKOWSKA K. E. Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 137, p. 149–158, 2013.
- WALERON, M.; MISZTAKA, A.; WALERONA, M.; FRANZUK, M.; WIELGOMAS, B.; WALERON, K. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruvienne* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. xxx, p. 1-9, 2017.
- WHANG, G. F.; PRAPHAT, K.; XIE, G. L.; ZHU, B.; LI, B.; LIU, B.; ZHOU, Q. Bacterial Wilt of Mulberry (*Morus alba*) Caused by *Enterobacter cloacae* in China. **Plant disease**, Saint Paul, v. 92, n. 3, p. 483, 2008.

WINSLOW, C. E. A.; BROADHURST, J.; BUCHANAN, R. E.; KRUMWIEDE J. R.; ROGERS, L. A.; SMITH, G. H. The families and genera of the bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types, **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 5, p. 191-229, 1917.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C. Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial *atpD*, *carA*, and *recA* as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences, **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 30, n. 5, p. 343-54, 2007.

ZHANG, Y.; QIU, S. Examining phylogenetic relationships of *Erwinia* and *Pantoea* species using whole genome sequence data. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 108, p. 1037–1046, 2015.

ZHU, B.; LOU, M. M.; XIE, G. L.; WANG, G. F.; ZHOU, Q.; WANG, F.; FANG, Y.; SU T.; LI, B.; DUAN, Y. P. *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 2769-2774, 2011.

CAPÍTULO II

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS PECTINOLÍTICAS CAUSADORAS DE
PODRIDÃO MOLE EM HORTALIÇAS CULTIVADAS EM DIFERENTES ZONAS
CLIMÁTICAS DO NORDESTE BRASILEIRO**

Plant Disease

1 **Diversidade de bactérias pectinolíticas causadoras de podridão mole em hortaliças**
2 **cultivadas em diferentes zonas climáticas do Nordeste brasileiro**

3
4 **Alessandra J. G. Moraes** e **Rosa L. R. Mariano**, Departamento de Agronomia, Universidade
5 Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil; **Elineide B. Souza**,
6 Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900,
7 Pernambuco, Brasil; **Adriano M. F. Silva** e **Ana R. Peixoto**, Universidade Federal Rural de
8 Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil; **Valdir Q. Balbino** e **Heidi L. A. Cruz**,
9 Departamento de Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50670-901,
10 Pernambuco, Brasil. **Marco A. S. Gama**, † Departamento de Agronomia, Universidade Federal
11 Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.

12
13
14 **Resumo**

15 A podridão mole é considerada uma doença economicamente importante no Brasil e no
16 mundo, sendo relatada em todas as regiões agrícolas e em diversas plantas hospedeiras. O
17 presente estudo utilizou a região 16S rDNA e a técnica de análise de sequências multilocus
18 (MLSA) com os genes *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA*, *gyrA*, *ropS*, *recA*, *dnaX*, *fusA* e *rplB* para
19 identificar a diversidade de bactérias causadoras de podridão mole em hortaliças cultivadas em
20 diferentes zonas climáticas (Zona da Mata, Agreste e Sertão) do estado de Pernambuco. Com
21 base na região 16S rDNA, 177 isolados foram relacionados a gêneros da família
22 Enterobacteriaceae, a saber: *Pectobacterium* (114), *Dickeya* (15), *Enterobacter* (10), *Kluyvera*
23 (3), *Klebsiella* (8), *Leliottia* (1), *Morganella* (1) e *Rahnella* (3). Por meio de MLSA, 64 isolados
24 foram identificados como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, 47 como *P.*
25 *aroidearum*, dois como *Dickeya chrysanthemi*, quatro como *D. dadantii* subsp. *dadantii*, um
26 como *D. zae*; cinco como *Enterobacter cloacae*, cinco *Enterobacter aerogenes* três como
27 *Kluyvera georgiana*, quatro como *Klebsiella oxytoca*, quatro como *Klebsiella pneumoniae*, um
28 como *Leliottia amnigena*, um como *Morganella morganii* e um como *Rahnella aquatilis*. Foi
29 detectada elevada diversidade de gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae causando
30 podridão mole em hortaliças nas diferentes zonas climáticas do estado de Pernambuco. A alface
31 é a hortaliça mais suscetível ao ataque das enterobactérias, incluindo bactérias que são
32 patogênicos ao homem. As espécies de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e *P. aroidearum* são
33 prevalentes nas mesorregiões estudadas.

† Autor para correspondência: Marco A.S. Gama;
E-mail: marco.gama@ufrpe.br

34 *Raoutella terrigena* em abobora e alface, *L. amnigena* em abobrinha e *K. georgiana* em alface,
35 berinjela e pimentão.

36

37

38 **Abstract**

39 The soft rot is considered an economically important disease in Brazil and worldwide and has
40 been reported in all agricultural regions and in several host plants. We used the 16S rDNA
41 region and multilocus sequence analysis (MLSA) with the *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA*, *gyrA*, *ropS*,
42 *recA*, *dnaX*, *fusA* and *rplB* genes to identify the diversity of bacteria causing soft rot in
43 vegetables grown in different climatic zones (forest, intermediary zone and semiarid) in the
44 Pernambuco state. Based on the 16S rDNA region, 177 strains were related to different genera
45 of the Enterobacteriaceae family, namely *Pectobacterium* (114), *Dickeya* (15), *Enterobacter*
46 (10), *Kluyvera* (3), *Klebsiella* (8), *Lelliottia* (1), *Morganella* (1) e *Rahnella* (3). Using MLSA,
47 64 strains were identified as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, 47 as *P.*
48 *aroidearum*, two as *Dickeya chrysanthemi*, four as *D. dadantii* subsp. *dadantii*, one as *D. zea*;
49 five as *Enterobacter cloacae*, five as *E. aerogenes*, three as *Kluyvera georgiana*, four as *K.*
50 *oxytoca*, two as *Klebsiella pneumonia* subsp. *ozanae*, two as *K. michiganensis*, one as *Lelliottia*
51 *amnigena*, one as *Morganella morganii*, and one as *Rahnella aquatilis*. We detected high
52 diversity of genera and species of the family Enterobacteriaceae causing soft rot in vegetables
53 in the different climatic zones of the state of Pernambuco. Lettuce is the most susceptible
54 vegetable to the attack of enterobacteria, including bacteria that are pathogenic to man. The
55 species of *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* and *P. aroidearum* are prevalent in the
56 mesoregions studied.

57

58

59 A podridão mole é considerada uma doença economicamente importante no Brasil e no
60 mundo (Félix et al. 2014; Zhang et al. 2012), tendo sido relatada em todas as regiões agrícolas
61 e em diversas plantas hospedeiras (Ma et al. 2007). No estado de Pernambuco, a podridão mole
62 tem causado perdas consideráveis, principalmente sob condições de temperatura e umidade
63 elevada (Félix et al. 2014). Nesse contexto, levantamentos realizados em 2004 demonstraram
64 uma prevalência de podridão mole em 100% dos campos cultivados com couve-chinesa e em
65 45,2% dos campos cultivados com alface, evidenciando a importância da doença para essas
66 culturas (Silva et al. 2007). A doença pode ser causada por diferentes gêneros e espécies
67 pertencentes à família Enterobacteriaceae, a qual é formada por um grupo grande e diverso de

68 bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos e que habitam
69 diversos nichos ecológicos, podendo ser encontradas no solo, na água e causando doenças em
70 plantas, insetos, animais e no homem (Adeolu et al. 2016).

71 Diversos gêneros fitopatogênicos compõe a família Enterobacteriaceae, os quais
72 destacam-se por serem economicamente devastadores como *Dickeya*, *Pectobacterium*,
73 *Brenneria*, *Erwinia* e *Pantoea*, além de importantes patógenos humanos como *Escherichia*,
74 *Klebsiella*, *Salmonella*, entre outras. Os gêneros *Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp. tem
75 causado perdas econômicas em diferentes culturas, estão listadas entre as 10 bactérias
76 fitopatogênicas mais devastadoras do mundo (Mansfield et al. 2012). Essas bactérias possuem
77 distribuição global, afetando hortaliças tais como alface, beterraba, cebola, cenoura, couve-
78 chinesa, couve-flor, mandioquinha salsa, pimentão, repolho e tomate (Lopes e Henz 1998;
79 Pérombelon 2002). Além disso, a maioria dessas bactérias não tem especificidade, sendo
80 comum o isolamento de mais de uma espécie a partir de uma planta doente (Mariano et al.
81 2005).

82 A região 16S rDNA tem sido bastante utilizada para diferenciar gêneros bacterianos
83 (Brady et al. 2008) e em estudos filogenéticos dos gêneros e espécies da família
84 Enterobacteriaceae causadores de podridões moles em hortaliças (Gardan et al. 2003; Hauben
85 et al. 1998, Samson et al. 2005). No entanto, apesar de ser utilizada frequentemente nesses
86 estudos, a região 16S rDNA apresenta baixo poder de resolução para discriminação de
87 organismos estreitamente relacionados (Stanley 2006; Nabhan et al. 2012). Nesses casos, uma
88 resolução filogenética mais acurada pode ser obtida através da realização de análises
89 filogenéticas baseadas em genes que codificam proteínas (Glaeser e Kampfer 2015).

90 A técnica de análise de sequências multilocus (MLSA) baseia-se na análise das
91 sequências de nucleotídeos de vários genes *housekeeping*, os quais são conservados e essenciais
92 para a manutenção de funções celulares básicas encontradas em qualquer organismo (Almeida
93 et al. 2001; Marcelletti et al. 2010). Atualmente essa abordagem tem sido utilizada para estudos
94 taxonômicos e para identificação de procariotos, caracterizando-se como um método rápido e
95 eficiente para classificação e identificação de bactérias da família Enterobacteriaceae (Young e
96 Park 2007; Brady et al. 2008). Adicionalmente, os genes *housekeeping gapA* (gliceraldeído-3-
97 fosfato-desidrogenase A), *icdA* (isocitrato desidrogenase, específica para NADP+), *mdh*
98 (malato desidrogenase), *proA* (gama glutamil fosfato redutase), *gyrA* (girase A), *ropS* (RNA
99 polimerase fator sigma RpoS), *recA* (recombinase A), *dnaX* (DNA polimerase subunidade
100 tau/gama), *fusA* (fator de alongação G) e *rplB* (proteína 50S ribossomal L2) têm sido

101 empregados extensamente no estudo dos organismos dessa família (Ma et al. 2007; Warelton et
102 al. 2008; Slawick et al. 2009; van der Wolf et al. 2014).

103 Em Pernambuco, estudos sobre a diversidade de bactérias que causam podridão mole
104 em hortaliças são inexistentes. Portanto, visto que o conhecimento da diversidade dessas
105 bactérias caracteriza-se como essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo da
106 doença (Czarjowski et al. 2015; Perombelon 2002), o presente estudo utilizou a região 16S
107 rDNA e a técnica de MLSA com os genes *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA*, *gyrA*, *ropS*, *recA*, *dnaX*, *fusA*
108 e *rplB* para identificar a diversidade das bactérias causadoras de podridão mole em hortaliças
109 cultivadas em diferentes zonas climáticas do estado de Pernambuco.

110

111 **Materiais e Métodos**

112 **Obtenção de isolados.** Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de hortaliças com
113 sintomas de podridão mole oriundas de plantios comerciais localizados em municípios da Zona
114 da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco (Tabela 1). A identificação preliminar dos isolados
115 foi realizada em meio CPG (1 g caseína hidrolisada, 10 g peptona, 10 g glicose, 18 g ágar,
116 completando-se o volume com água destilada esterilizada (ADE) até 1000 mL), no qual
117 colônias jovens (36-48 h) de bactérias pectinolíticas apresentaram aspecto de “vidro quebrado”
118 quando visualizadas em lupa sob iluminação oblíqua (Kelman e Dickey 1995). Após a
119 identificação preliminar, os isolados foram preservados em ADE e por liofilização e, em
120 seguida, armazenados na Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de
121 Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

122 **Testes de patogenicidade em batata, couve-chinesa e pimentão.** Para testar a
123 patogenicidade a pimentão e batata, os isolados foram cultivados em meio CPG por 48 h a
124 temperatura de 28°C. Colônias bacterianas foram tocadas com auxílio de palito de dente
125 esterilizado, o qual foi fincado em pimentões e tubérculos de batata (Hyman et al. 2001).

126 Para a patogenicidade em couve-chinesa, foram utilizadas suspensões bacterianas
127 [$A_{570} = 0,36 (\pm 1,0 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1})$] preparadas a partir do cultivo em meio CPG por 48 h a
128 temperatura de 28°C. As suspensões foram inoculadas pelo método de picada, que consistiu em
129 ferimento na nervura central da folha com alfinete entomológico a uma profundidade de 1 mm,
130 seguindo-se a deposição de 20 μL da suspensão bacteriana (Mariano et al. 2016). O controle do
131 experimento foi realizado com ADE.

132 Após as inoculações, as plantas, tubérculos e frutos foram submetidos à câmara úmida
133 por 6 h. As avaliações foram realizadas até 48 h após a inoculação.

134 **Extração de DNA, condições de PCR e sequenciamento da região 16S rDNA.** O
135 DNA dos isolados foi extraído com auxílio do kit Miniprep (Axigen Biosciences, USA) de
136 acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado usando BioDrop
137 (Cambridge, Reino Unido) e ajustado para concentração final de 10 ng/μL, sendo armazenado a
138 - 20° C.

139 Os isolados patogênicos ao pimentão, batata e couve-chinesa foram selecionados para
140 o sequenciamento da região 16S rDNA. Todas as amplificações de PCR foram compostas por
141 1X de Master Mix 2X (Promega,) (0,05 U/μL de Taq DNA polimerase, tampão de reação 4
142 Mm de MgCl₂, 0,4 Mm de cada dNTP), 10 μM de cada *primer* e 100 ng de DNA.

143 A amplificação da região 16S rDNA foi realizada com os *primers* yf1 (5'-TGA TGG
144 AGG GGG ATA ACT ACT GGA-3') e yr1 (5'-CCC CTA CGG TTA CCT TGT TAC GAC-
145 3') (Hauben et al. 1998) em termociclador Tgradient (Biometra, Goettingen, Alemanha) com
146 as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94° C durante 4 minutos; 35 ciclos de 94° C durante
147 1 minuto, 63° C durante 1 minuto e 72° C durante 2 minutos; e extensão final a 72° C durante
148 7 minutos. As reações foram purificadas utilizando-se 5 μL do produto de PCR acrescidos de
149 3,8 μL de água ultrapura, 0,25 μL de fosfatase alcalina, 0,5 μL de tampão fosfatase alcalina,
150 0,125 μL de exonuclease e 0,5 μL de tampão exonuclease. As amostras foram postas em
151 termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95° C durante 3 min; 30 ciclos
152 de 94° C durante 0,5 min, 52° C durante 0,5 min e 72° C durante 1 min; e extensão final a 72°
153 C durante 6 min. Após a reação de purificação o sequenciamento foi conduzido em
154 sequenciador automatizado ABI3730 pertencente ao Laboratório de Bioinformática e Biologia
155 Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco (LABBE-UFPE).

156 Os isolados foram identificados com base na comparação das sequências de
157 nucleotídeos da região 16S rDNA com as sequências dos isolados tipo dos gêneros e espécies
158 disponíveis no banco de dados do GenBank (National Center for Biotechnology Information -
159 NCBI), usando o software BLASTn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Todas as sequências da
160 região 16S rDNA dos isolados utilizados nesse trabalho foram depositadas no GenBank. As
161 sequências dos isolados identificados como membros da mesma espécie foram utilizadas para
162 construção de redes de haplótipos utilizando-se o software DNASP v. 5.0 (Librado e Rozas
163 2009).

164 **Construção de rede de haplótipos.** Com base na identificação preliminar realizada por
165 meio da região 16S rDNA, os isolados foram separados em grupos de gêneros e espécies. Foram
166 construídas redes de haplótipos com os isolados do gênero *Pectobacterium* utilizando-se o gene
167 *mdh*, para os isolados de *Dickeya* utilizou-se o gene *dnaX* e para os demais gêneros e espécies

168 utilizou-se o gene *rplB*. A construção das redes de haplótipos foi realizada com auxílio do
169 software DNASP v. 5.0 (Librado e Rozas 2009) e, a partir dos dados gerados, os haplótipos de
170 cada espécie foram selecionados para as demais análises.

171 **Análise de sequências multilocus.** Foram utilizados conjuntos de genes específicos
172 para identificação das espécies de *Pectobacterium* (*icdA*, *gapA*, *mdh*, *proA*, *recA*), *Dickeya*
173 (*dnaX*, *fusA*, *gyrA*, *recA*, *rplB* e *rpoS*) e das demais espécies identificadas nos diferentes gêneros
174 (*dnaX*, *icdA*, *gapA*, *mdh*, *proA* e *rplB*) por meio do sequenciamento da região 16S rDNA. Os
175 *primers* utilizados e as condições de amplificação são descritos na Tabela 2. A purificação das
176 amostras e os sequenciamentos foram realizados conforme descrito anteriormente.

177 A análise das sequências de DNA e a montagem dos contigs foram realizadas com o
178 auxílio do Staden Package (Staden et al. 1998). As sequências de nucleotídeos foram
179 comparadas com as sequências de isolados disponíveis no banco de dados do GenBank usando
180 o software BLASTn. As sequências de isolados tipos dos gêneros e espécies pertencentes à
181 família Enterobacteriaceae foram incluídos no alinhamento em todas análises e estão descritas
182 na Tabela 3.

183 Os alinhamentos das sequências foram realizados através do programa de alinhamento
184 múltiplo para sequências de aminoácidos ou nucleotídeos on-line, MAFFT versão 7 (Katoh e
185 Toh 2013).

186 Análises de Inferência Bayesiana (IB) foram realizadas com auxílio do Mr. Bayes v.
187 3.2.6 (Ronquist et al. 2012) implementado no CIPRES
188 (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>) usando os melhores modelos de substituição de
189 nucleotídeos selecionados de acordo com Aikake's Information Criterion (AIC) por meio do
190 Mr. Modeltest 2.3 (Nylander 2004), com 1.000.000.000 gerações de Monte Carlo Cadeia de
191 Markov (MCMC), sendo realizadas amostragem a cada 1000 e 10.000 gerações. As
192 probabilidades posteriores foram calculadas após o descarte das primeiras 25% gerações. Todas
193 as árvores obtidas a partir dos genes individuais e concatenados pelo método de IB foram
194 visualizadas com o programa Fig Tree 1.4.1. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

195

196 **Resultados**

197 **Isolamentos e testes de patogenicidade.** Foram obtidos um total de 676 isolados a
198 partir de tecidos apodrecidos de abobora, abobrinha, alface, berinjela, brócolis, cebola, couve-
199 chinesa, couve comum, pimentão, rabanete, repolho, rúcula e salsa cultivadas em municípios
200 da zona de mata, Agreste e Sertão de Pernambuco. Desses isolados, 177 apresentaram
201 capacidade de causar podridão mole em frutos pimentão, tubérculos de batata e folhas de couve-

202 chinesa. Foram obtidos 79 isolados da Zona da Mata, 55 do Agreste e 43 isolados do Sertão
203 (Tabela 1).

204 **Região 16S rDNA.** As sequências dos 177 isolados patogênicos a pimentão, batata e
205 couve-chinesa foram comparados com as sequências de nucleotídeos disponíveis no banco de
206 dados do GenBank por meio da ferramenta BLASTn. Os isolados apresentaram entre 96 e
207 100% de identidade (Tabela 1) com os isolados tipo das espécies descritas a seguir, sendo
208 distribuídos nos gêneros *Pectobacterium* (64%), com 47 isolados identificados como *P.*
209 *aroidearum*, 10 isolados como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 64 como *P.*
210 *carotovorum* subsp. *brasiliensis*, e um como *P. carotovorum* subsp. *actinidae*; *Dickeya* (8,4%),
211 com oito isolados identificados como *Dickeya chrysanthemi*, quatro como *D. dadantii* subsp.
212 *dadantii* e um como *D. zae*; *Enterobacter* (5,6%), com cinco isolados identificados como *E.*
213 *cloacae* e cinco como *Enterobacter aerogens*; *Kluyvera* (1,69%), com três isolados
214 identificados como *Kluyvera georgiana*; *Klebsiella* (4,5%), com quatro isolados identificados
215 como *Klebsiella oxytoca* e quatro como *K. pneumoniae*; *Leliottia* (0,5%), com um isolado
216 identificado como *Leliottia amnigena*; *Morganella* (0,5%), com um isolado identificado como
217 *Morganella morganii* e *Rahnella* (1,6%) com três isolados identificados como *Rahnella*
218 *aquatilis* (Figura 1).

219 **Construção de rede de haplótipos.** Por meio do gene *mdh* foram determinados quatro
220 haplótipos para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (CCRM64, CCRM66, CCRM162 e
221 CCRM185), oito para *P. aroidearum* (CCRM35, CCRM109, CCRM112, CCRM173,
222 CCRM178, CCRM508, CCRM637 e CCRM670), quatro para *P. carotovorum* subsp.
223 *carotovorum* (CCRM99, CCRM339, CCRM388 e CCRM628), dois para *P. carotovorum*
224 subsp. *actinidae* (CCRM15 e CCRM623). Por meio do gene *dnaX* foram determinados três
225 haplótipos para *D. chrysanthemi* (CCRM213, CCRM265 e CCRM654), um para *D. zae*
226 (CCRM101), um para *D. dadantii* subsp. *dadantii* (CCRM101). Por meio do gene *rplB* foram
227 encontrados três haplótipos para *E. cloacae* (CCRM480, CCRM479 e CCRM490), três para *E.*
228 *asburiae* (CCRM485, CCRM635 e CCRM640), três para *K. pneumoniae* (CCRM 111,
229 CCRM117 e CCRM229), dois para *K. oxytoca* (CCRM234 e CCRM592), um para *M. morganii*
230 (CCRM44) e um para *R. aquatilis* (CCRM633).

231 **Análise de sequências multilocus.** A árvore filogenética construída para identificação
232 das espécies do gênero *Pectobacterium* por meio de IB com os genes *gapA*, *icdA*, *madh*, *proA*
233 e *recA* apresentaram topologias semelhantes tanto para os genes isoladamente quanto para
234 sequência concatenada. Os isolados CCRM15, CCRM64, CCRM66, CCRM162, CCRM185,
235 CCRM399, CCRM623 e CCRM628 foram relacionados ao clado de *P. carotovorum* subsp.

236 *brasiliensis* (IBSBF1692^{TS}), o isolado CCRM339 foi identificado como *P. carotovorum* subsp.
237 *odoriferum* (LMG17566^{TS}), os isolados CCRM35, CCRM178, CCRM388 e CCRM670 foram
238 agrupados no clado de *P. aroidearum* (KC20) e os isolados CCRM99, CCRM109, CCRM112,
239 CCRM173, CCRM508, CCRM637 e CCRM644 não se agruparam com nenhuma espécie de
240 *Pectobacterium* (Figura 2).

241 A árvore filogenética construída para identificação das espécies do gênero *Dickeya* (5
242 haplótipos) pelo método de IB com os genes *dnaX*, *fusA*, *gyrA*, *recA*, *rplB* e *rpoS* apresentaram
243 topologias semelhantes tanto para os genes isoladamente quanto para sequência concatenada.
244 Utilizando-se esses métodos foi observada a presença de 5 grupos bem definidos no gênero
245 *Dickeya* (Figura 3). O haplótipo CCRM250 foi relacionado com *D. dadanti* subsp. *dadanti*
246 (CFBP1269^{TS}), os haplótipos CCRM213 e CCRM265 foram relacionados a *D. chrysanthemi*
247 (CFBP2048^{TS}) e o isolado CCRM101 foi relacionado a *D. zeae* (CFBP2052^{TS}). O isolado
248 CCRM654 não se agrupou com nenhuma espécie de *Dickeya*.

249 A árvore filogenética construída para identificação das espécies do gênero *Enterobacter*
250 (6 haplótipos) pelo método de IB com os genes *dnaX*, *icdA*, *gapA*, *mdh*, *proA* e *rplB*
251 apresentaram topologias semelhantes tanto para os genes isoladamente quanto para sequência
252 concatenada. Foi observada a presença de 5 grupos bem definidos no gênero *Enterobacter*
253 (Figura 4). Os haplótipos CCRM479, CCRM480, CCRM490 foram relacionados a *E. mueller*
254 (LMG28480^{TS}), *E. massiliensis* (DSM26120) e *E. ludwigii* (DSM 16688^{TS}), respectivamente,
255 enquanto os haplótipos CRM485, CRM635 e CRM640 não se relacionaram com nenhuma
256 espécie de *Enterobacter*.

257 A árvore filogenética construída para identificação das espécies do gênero *Klebsiella* (5
258 haplótipos) pelo método de IB com os genes *dnaX*, *icdA*, *gapA*, *mdh*, *proA* e *rplB* apresentaram
259 topologias semelhantes tanto para os genes isoladamente quanto para sequência concatenada.
260 Os haplótipos CCRM234 e CCRM592 se relacionaram com *K. michiganensis* (ATCCBAA-
261 2403^{TS}), os isolados CCRM229 e CCRM111 se relacionaram com *K. pneumoniae* (ATCC
262 13883^{TS}) e o isolado CCRM117 não se relacionou com nenhuma espécie do gênero *Klebsiella*.

263 Foram construídas árvores filogenéticas com vários gêneros para alocar os isolados que
264 apresentaram um baixo número de indivíduos (Figura 5). A árvore filogenética construída pelo
265 método de IB com os genes *dnaX*, *icdA*, *gapA*, *mdh*, *proA* e *rplB* apresentaram topologias
266 semelhantes tanto para os genes isoladamente quanto para sequência concatenada. O isolado
267 CCRM40 foi relacionado à *M. morgani* subsp. *sibonii* (ATCC49948^{TS}), o isolado CCRM75
268 foi relacionado a *P. vermicola* (DMS 17385^{TS}), o isolado CCRM633 foi relacionado a *R.*
269 *inuitata* (LMG2640^{TS}), os isolados CCRM671 e CCRM 660 foram relacionados a *R. terrigena*

270 (ATCC 33257^{TS}), o isolado CCRM491 foi relacionado a *L. nimipressuralis* e os isolados
271 CCRM156, CCRM636 e CCRM649 foram relacionados a *K. georgiana* (ATCC51603^{TS}).

272

273 **Discussão**

274 Os 177 isolados utilizados no presente estudo foram patogênicos a pimentão, batata e
275 couve chinesa e incitaram os sintomas característicos de podridão mole em até 48 horas após a
276 inoculação. A patogenicidade a três hospedeiros distintos foi avaliada para selecionar isolados
277 comprovadamente patogênicos e capazes de causar podridão mole em diferentes hortaliças,
278 descartando a hipótese de utilização de patógenos oportunistas.

279 Devido a elevada diversidade de bactérias com capacidade de causar podridão mole
280 (Mariano et al. 2005), inicialmente foram realizadas análises da região 16S rDNA para
281 identificação preliminar dos gêneros presentes no estado de Pernambuco. O sequenciamento da
282 região 16S rDNA tem auxiliado na distinção entre diferentes grupos bacterianos (Patwardhan
283 et al. 2014), pois possui regiões variáveis e conservadas exclusivas de grupos filogenéticos
284 distintos (Chen et al. 1989; Pfister et al. 2003). Além disso, por se tratar de um gene presente
285 em todas as bactérias, sequências da região 16S rDNA de bactérias desconhecidas podem ser
286 comparadas com sequências de bactérias depositadas em bancos de dados (Clarridge 2004;
287 Patwardhan et al. 2014). Portanto, por meio de análises de BLASTn da região 16S rDNA, foi
288 observado que além de espécies e subespécies de *Pectobacterium* e *Dickeya*, espécies dos
289 gêneros, *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Rahnella* e *Raoutella*
290 estavam associados às hortaliças com podridão mole. De modo semelhante, a região 16S rDNA
291 foi utilizada para identificar isolados de *Pectobacterium*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter* e
292 *Providencia* causadores de podridão mole em orquídeas na Indonésia (Joko et al. 2014).

293 Após a utilização da região 16S rDNA para identificação dos gêneros dos isolados
294 analisados, a MLSA foi realizada para identificar acuradamente as espécies envolvidas com a
295 podridão mole nas diferentes zonas climáticas do estado de Pernambuco. A técnica de MLSA
296 realizada com os genes *icdA*, *gapA*, *mdh*, *recA* e *proA* (Ma et al. 2007) confirmou como *P.*
297 *carotovorum* subsp. *brasiliensis* os quatro haplótipos formados com base na região 16S rDNA
298 e representativos dos 64 isolados dessa bactéria. Esse resultado indica uma provável prevalência
299 de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* em diferentes hortaliças no estado de Pernambuco. A
300 detecção dessa bactéria no estado é recente (Moraes et al. 2017) e contraria estudos anteriores
301 que atribuíram *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* como a espécie prevalente no estado
302 (Alvarado et al. 2011, Félix, 2014, Silva, 2005).

303 A análise da região 16S rDNA dos isolados CCRM628 e CCRM388 indicou um maior
304 relacionamento com o isolado tipo de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (ATCC15713^{TS}),
305 assim como indicou um maior relacionamento do isolado CCRM15 com o isolado tipo de *P.*
306 *carotovrum* subsp. *actinidae* (KKH3^{TS}). No entanto, as árvores de IB revelaram uma maior
307 aproximação desses isolados com o isolado tipo (IBSBF1692TM) de *P. carotovorum* subsp.
308 *brasiliensis* (CCRM15 e CCRM628) e de um isolado (KC20) de *P. aroidearum* (CCRM388).
309 Semelhantemente, o isolado CCRM339, oriundo de alface e identificado por meio da região
310 16S rDNA como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, abrigou-se com o isolado tipo de *P.*
311 *carotovorum* subsp. *odoriferum* (LMG 17566^{TS}). Essa bactéria foi identificada inicialmente
312 como agente causal de podridão mole em chicória na França, sendo posteriormente verificada
313 como agente causal de podridão mole em outros hospedeiros como cenoura e batata (Warelon
314 et al. 2014). Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de *P. carotovorum* subsp.
315 *odoriferum* causando podridão mole em alface no Brasil.

316 O isolado CCRM644, identificado previamente por meio da região 16S rDNA como
317 *Pantoea*, foi analisado junto com as espécies de *Pectobacterium* pelo fato dos sequenciamentos
318 com os genes *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA* e *recA* terem indicado que esse isolado foi mais
319 relacionado a *P. aroidearum*. Entretanto, não foi possível confirmar a identificação da espécie
320 do isolado CCRM 99 por meio da MLSA. Isto pode ter ocorrido pelo fato de *P. carotovorum*
321 apresentar-se como um grupo muito heterogêneo (Dess et al. 2017).

322 O gênero *Dickeya* engloba um grupo heterogêneo que pode ser delineado por meio de
323 MLSA utilizando-se sequencias dos genes *dnaX*, *fusA*, *gyrA*, *recA*, *rplB* e *rpoS* (van der Wolf
324 et al. 2014). Apenas quatro isolados do gênero *Dickeya* foram identificados, representando
325 2,8% dos isolados selecionados para esse estudo. Foram encontrados dois isolados de *D.*
326 *chrysanthemi*, um de *D. zae* e um de *D. dadantii* subsp. *dadantii*, todos causando podridão
327 mole em alface. Os relacionamentos revelados pela análise de IB sugeriram que o isolado
328 CCRM250 pertence à espécie de *D. dadanti* subsp. *dadanti*, confirmando o resultado obtido a
329 partir da região 16 S rDNA. Essa espécie tem sido relatada causando podridão mole em uma
330 ampla gama de espécies de plantas incluindo konjac (Wei e Wei 2014), banana (Liu et al. 2016)
331 e batata (Delfan et al. 2015). Esse patógeno já foi relatado em diversos países e é bastante
332 agressivo e devastador, principalmente à cultura da batata (Perombelon 2002). Para o nosso
333 conhecimento, esse é o primeiro relato de *D. dadantii* subsp. *dadantii* causando podridão mole
334 em alface no estado de Pernambuco.

335 A análise de IB indicou que os isolados CCRM479, CCRM480, CCRM490, oriundos
336 de abobrinha e do Agreste, foram relacionados a *E. bugandensis* (LMG 28480^{TS}), *E.*

337 *massiliensis* (DSM 26120^{TS}), *E. ludwigii* (DSM 16688^{TS}), respectivamente, enquanto os
338 isolados CCRM485, CCRM640 e CCRM635 não se agruparam com nenhuma espécie do
339 gênero *Enterobacter*. Visto que o gênero *Enterobacter* apresenta elevada diversidade genética
340 e contém vários membros que formam complexos, a lista de espécies tem crescido
341 constantemente conforme novas espécies de *Enterobacter* tem sido identificadas (Lagier et al.
342 2013). Portanto, estudos polifásicos deverão ser desenvolvidos para verificar a possibilidade de
343 classificação dos isolados CCRM485, CCRM640 e CCRM 635 como espécies novas.

344 Diversas espécies de *Enterobacter* tem sido frequentemente isoladas de pacientes com
345 pneumonia ou infecções do trato urinário (Lagier et al. 2013; Humann et al. 2011). Contudo, *E.*
346 *cloacae* tem sido relatada causando podridão mole em cebola (Schroeder et al. 2010), gengibre
347 (Nishijima et al. 2004), mamão, macadamia (Humann et al. 2011) e pituaia (Masyahit et al.
348 2009). Moreira et al. (2013) detectaram *E. cloacae* em Minas Gerais causando podridão mole
349 em gengibre e verificaram que os isolados coletados apresentaram níveis elevados de
350 agressividade. A ocorrência de *E. muelleri*, *E. massiliensi* e *E. ludwigii* causando podridão mole
351 em abobrinha, é o primeiro relato dessas bactérias causando podridão mole em Pernambuco.

352 As espécies do gênero *Klebsiella* são conhecidas por serem patogênicas ao homem
353 (Struve et al. 2004). A análise filogenética utilizando a IB alocaram os isolados CCRM234 e
354 CCRM592, oriundos de alface e da Zona da Mata, e de repolho no Agreste, respectivamente,
355 como *K. michiganensis* (ATCC BAA-2403^{TS}) e os isolados CCRM 229 e CCRM111, ambos
356 oriundos de alface na Zona da Mata, como *K. pneumoniae* subsp. *ozanae* (LMG3113ST), a qual
357 é bem conhecida por causar doenças pulmonares e urinárias em seres humanos e animais
358 (Struve e Krogfelt 2008). *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* foi relatada causando podridão
359 mole em cebola (Liu et al. 2015) e outras espécies de *Klebsiella* também já foram relatadas
360 causando doenças em plantas, como *K. variicola*, causando podridão mole em banana (Fan et
361 al. 2016) e *K. oxytoca*, causando podridão mole em rabanete, cebola e tomate (Al-Kharousi et
362 al. 2016). Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de *K. michiganensis* e *K.*
363 *pneumoniae* subsp. *ozanae* causando podridão mole em repolho e alface, respectivamente.

364 *Morganella morganii* tem sido encontrada comumente no meio ambiente e no trato
365 gastrointestinal de humanos, mamíferos e répteis (Janda et al. 1996) e até o presente momento
366 não existem relatos dessa espécie causando podridão mole em plantas. Contudo, a análise de
367 IB alocou o isolado CCRM44, o qual foi detectado causando podridão mole em couve chinesa
368 na mesorregião do Agreste, junto com a espécie *M. morganii* subsp. *sibonii*. Esse o primeiro
369 relato dessa espécie causando podridão mole em couve-chinesa no Brasil e no mundo.

370 As espécies do gênero *Rahnella* apresentam-se amplamente distribuída no meio
371 ambiente, podendo ser encontrada na água, solo, rizosfera de plantas cultivadas, no trato
372 intestinal de caracóis e ocasionalmente em alimentos e amostras clínicas humanas (Brady et al.
373 2014). A análise de IB relacionou o isolado CCRM633, oriundo de coentro japonês no Sertão,
374 como pertencente a espécie *R. inusitata*. Até o presente momento, não se tem relato dessa
375 bactéria causando podridão mole em plantas. Portanto, esse é o primeiro relato de *R. inusitata*
376 causando podridão em coentro no Brasil e no mundo.

377 O gênero *Lelliottia* foi proposto por Brady et al. e atualmente compreende duas espécies:
378 *L. amnigena* e *L. nimipressuralis* (Brady et al. 2013). Essas espécies têm sido encontradas na
379 água, produtos alimentares e tecidos vegetais, sendo *L. nimipressuralis* relatada como agente
380 causal de cancro em espécies florestais (Nowick et al. 2014). Por sua vez, *L. amnigena* também
381 foi relatada causando podridão mole em cebola durante a fase de pós-colheita na China (Liu et
382 al. 2016). Adicionalmente, os relacionamentos baseados nas análises de BI indicaram que o
383 isolado CCRM491, obtido de abobrinha e do Agreste, se relacionou com *L. nimipressuralis*,
384 sendo esse o primeiro relato dessa bactéria causando podridão mole em coentro no Brasil.

385 As espécies do gênero *Kluyvera* são encontradas no solo, água, frutas, vegetais e
386 produtos de origem animal. A ecologia das espécies desse gênero é variável, bem como o
387 potencial patogênico para homens, animais e plantas (Possuelo e Renne 2015). No presente
388 estudo, os relacionamentos baseados nas análises de IB indicaram que os isolados de oriundos
389 de pimentão na Zona da Mata (CCRM 156), e os isolados de alface (CCRM636) e berinjela
390 (CCRM649) oriundos do Sertão se relacionaram com *K. georgiana* (ATCC 51603). Para o
391 nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de *K. georgiana* causando podridão mole em
392 pimentão, alface e berinjela.

393

394 **Conclusões**

395 Foi detectada elevada diversidade de gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae
396 causando podridão mole em hortaliças nas diferentes zonas climáticas do estado de
397 Pernambuco. A alface é a hortaliça mais suscetível ao ataque das enterobactérias, incluindo
398 bactérias que são patogênicos ao homem. Os isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasileinsis* e
399 *P. aroidearum* são as espécies prevalentes nas mesorregiões de Pernambuco.

400

401 **Agradecimentos**

402 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela
403 concessão da bolsa de estudos de Alessandra Jackeline Guedes de Moraes.

404 **Referências**

- 405 Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., Gupta, S. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy
406 of the ‘Enterobacteriales’: proposal for *Enterobacterales* ord. Nov. divided into the
407 families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam.
408 nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov.,
409 and *Budviciaceae* fam. nov Int. J. Syst. Evol. Microbiol.:66:5575-5599.
410
- 411 Al-Kharousi, Z. S, Guizani, N., Al-Sadi, A. M., Al-Bulushi, I. M., and Shaharoon, B. 2016.
412 Hiding in Fresh Fruits and Vegetables: Opportunistic Pathogens May Cross
413 Geographical Barriers. Int. J. Microbiol. 2016. Article ID 4292417, 14 pages.
414 doi:10.1155/2016/4292417
- 415 Almeida, N.F., Yan, S.C., Cai, R. M., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel,
416 E. L., Lacy, G. H., Sun, X. A., Jones, J.B., Castillo, J. A., Bull C. T., Leman, S.,
417 Guttman, D. S., Setubal, J. C., and Vinatzer, B. A. 2010. A multilocus sequence typing
418 and analysis database and website for plant-associated Microbes, *Phytopathology* 100:
419 208-215.
420
- 421 Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S. N., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T.A. 2008.
422 Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the
423 natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA) *Syst. Appl.*
424 *Microbiol.* 31: 447-460.
425
- 426 Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T. and de Vos, P. 2013. Taxonomic evaluation
427 of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to
428 reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia*
429 *nimipressuralis* comb. Nov. and *Lelliottia amnigena* comb. Nov., respectively, *E.*
430 *gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter*
431 *gergoviae* comb. Nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. Nov., respectively, *E.*
432 *cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov.
433 as *Kosakonia cowanii* comb. Nov., *Kosakonia radicincitans* comb. Nov., *Kosakonia*
434 *oryzae* comb. Nov. and *Kosakonia arachidis* comb. Nov., respectively, and *E.*
435 *turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter*
436 *zurichensis* nom. Nov., *Cronobacter helveticus* comb. Nov. and *Cronobacter*

- 437 *pulveris* comb. Nov., respectively, and emended description of the
438 genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. Syst. Appl. Microbiol. 36: 309-319
439
- 440 Brady, C., Hunter, G., Kirk, S., Arnold, and D., Denman, S. 2014. *Rahnella victoriana* sp. nov.,
441 *Rahnella bruchi* sp. nov., *Rahnella woolbedingensis* sp. nov., classification of *Rahnella*
442 *genomospecies* 2 and 3 as *Rahnella variigena* sp. nov. and *Rahnella inusitata* sp. nov.,
443 respectively and emended description of the genus *Rahnella*. Syst Appl Microbiol.
444 37:8:545-52.
445
- 446 Chen, K., Neimark, H., Rumore, P., and Steinman, C. R. 1989. Broad range DNA probes for
447 detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. FEMS Microbiol Lett 48: 19-24.
448
- 449 Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S Rrna Gene Sequence Analysis for identification of bacteria
450 on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol. Ver. 17: 840–862.
451
- 452 Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van der Wolf, J.
453 M., Sledz, W. 2015. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and
454 *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. Ann. Appl. Biol.
455 166: 18-38.
456
457
- 458 Delfan, S. A., and Etemadifar, Z., Emtiazi, G., and Bouzari, M. 2015. Isolation od *D. dadantii*
459 strains from potato disease and biocontrole by their bacteriophages Braz. J. Microbiol.
460 46:3:791-797.
461
- 462 Dess, M. W., Lisoe, E., Rossmann, S., Perminow, J., and Bruebeg, M. B. 2017. *Pectobacterium*
463 *polaris* sp. Nov., isolated from potato. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67:5222-5229.
464
- 465 Fan, H. C., Zeng, L., Yang, P. W., Guo, Z. X., e Bai, T. T. 2016. First Report of Banana Soft
466 Rot Caused by *Klebsiella variicola* in China. Plant dis. 100:2:517.
467
- 468 Félix, K. C. S., Oliveira, W. J., Mariano, R. L. R., e Souza, E. B. 2014. Lettuce genotype
469 resistance to “soft rot” caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.
470 Scientia Agricola 71: 287-29.

- 471
472 Glaeser, S. P., and Kämpfer P. 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic
473 taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 38:4:237–245.
474
- 475 Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., e Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies
476 of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp.
477 nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp.
478 nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:381–391.
479
- 480 Hauben L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., e
481 Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within
482 the *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol.* 21:384–397.
483
- 484 Hyman, L.J., Toth, I.K., Pérombelon, M.C.M. 2002. Isolation and identification. P. 66-77. In:
485 Pérombelon, M.C.M.; van der Wolf, J.M., eds. *Methods for the detection and*
486 *quantification of Erwinia carotovora subsp. atroseptica (Pectobacterium*
487 *carotovorum subsp. atrosepticum)* on potatoes: a laboratory manual. 2ed. Scottish Crop
488 Research Institute, Invergowrie, UK.
489
- 490 Humann, J. L., Wildung, M., Cheng, C. H., Lee, T., Stewart, J. E., Drew, J. C., Triplett, E.
491 W., Main, D., and Schroeder, B. K. 2011. Complete genome of the onion pathogen
492 *Enterobacter cloacae* EcWSU1. *Stand. Genomic Sci.* 5:279– 286.
493
- 494 Janda, M., Abbott, S. L., Khashe, and Robin, S. 1996. T. Biochemical Investigations of
495 Biogroups and Subspecies of *Morganella morganii*. *J. Clin. Microbiol.* 34:1:108-113.
496
- 497 Joko, T., Subandi, A., Kusumandari, N., Wibowo, A. e Priyatmojo, A. 2014. Activities of
498 plant cell wall-degrading enzymes by bacterial soft rot of orchid *Arch. Phytopathology*
499 *Plant Protect.* 47:10:1239-1250.
500
- 501 Katoh K, and Toh, H. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7:
502 improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772-780.
503

- 504 Kelman A., e Dickey R.S., 1995. Detection of *Erwinia carotovora* and *E. chrysanthemi*. In:
505 Saettler A.W., Schaad N.W., Roth, D.A. (eds). Detection of Bacteria on Seed and Other
506 Planting Material, pp. 76-91. APS Press, Saint Paul, USA.
507
- 508 Lagier J. C., El Karkouri K., Mishra A. K., Robert C., Raoult D., and Fournier, P. E.
509 2013. Noncontiguous finished genome sequence and description of *Enterobacter*
510 *massiliensis* sp. nov. Stand. Genomic Sci. 7:399–412.
511
- 512 Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA
513 polymorphism data. Bioinformatics 25:11:1451-1452.
514
- 515 Liu, S., Lv, M., Gu, Y., and Zhou, J. 2015. First report of bulb disease of onion caused
516 by *Klebsiella pneumonia* in China. Plant Dis. 99:12:1853.
517
- 518 Liu, Q., Xiao, W., Wu, Z., and Li, H. 2016. Identification of *Dickeya dadantii* as causal agente
519 of banana bacterial sheath rot in china. J. Plan Pathol. 98:3:503-510.
520
- 521 Liu, S Tang, Y., Wang, D., Lin, N. and Zhou, J. 2016. Identification and characterization of a
522 new Enterobacter onion bulb decay caused by *Lelliottia amnigena* in China. Appli.
523 Micro. Open Access 2:2
524
- 525 Lopes, C. A., e Henz, G. P. 1998. Podridões -moles das hortaliças causadas por bactérias.
526 Embrapa Hortaliças comunicado técnico 8:7
527
- 528 Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H. S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner,
529 J. D., Perna, N. T., Kelman, A., and Charkowski, A. O. 2007. Host range and molecular
530 phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*.
531 Phytopathology 97: 1150–1163.
532
- 533 Marcelletti, S., Ferrante, P. and Scortichini, M. 2010. Multilocus sequence typing reveals
534 relevant genetic variation and diferente evolutionary dynamics among strains
535 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* Diversity 2:1205:1222.
536

- 537 Mariano, R. L. M., Silveira, E. B., Alvarado, I. C. M., and Silva, A. M. F. 2005. Bactérias
538 fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. Anais da
539 Academia Pernambucana de Ciência Agronômica 2:121-153.
540
- 541 Mariano, R.L.R., and Assis, S.M.P. 2015. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In:
542 MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. (Eds.) Manual de práticas em fitobacteriologia.
543 2: 37-49.
544
- 545 Masyahit, M., Sijam, K., Awang, Y., and Satar, M. G. M. 2009. First report on bacterial soft rot disease
546 on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) caused by *Enterobacter cloacae* in Peninsular Malaysia Int. J.
547 Agric. Biol. 11: 659–666.
548
- 549 Mello, M. R. F., Silveira, E. B., Viana, I. O., Guerra, M. L., Mariano, R. L. R. 2011. Uso de
550 antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. Hort. Bras.
551 29:78-83.
552
- 553 Moraes, A. J. G., Souza, E. B., Mariano, R. L. R., Silva, A. M. F., Lima, N. B., Peixoto, A.R.,
554 Gama, M. A. S. 2017. First report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium*
555 *carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing soft rot of *Cucurbita pepo* in Brazil. Plant dis.
556 101:2:379.
557
- 558 Moreira, S. I., Dutra, D. C., Rodrigues, A. C., Oliveira, J. G., Dhingra, O. D., Pereira, O. L.
559 Fungi and bacteria associated with post-harvest rot of ginger rhizomes in Espírito Santo,
560 Brazil. Trop. Plant pathol. 38:3:218-226.
561
- 562 Nabhan, S. Boer, S. H., Maiss, E., and Wydra, K. 2012. Taxonomic relatedness
563 between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium*
564 *carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*
565 subsp. nov. J. Appl. Microbiol., 113:4: 904-913.
566
- 567 Nishijima, K. A., Alvarez, A. M., Hepperly, P. R., Shintaku, M. H., Keith, L. M., Sato, D. M.,
568 Bushe, B. C., Armstrong, J. W., and Zee, F. T. 2004. Association of *Enterobacter*
569 *cloacae* with rhizome rot of edible ginger in Hawaii. Plant Dis. 88:1318-1327.
570

- 571 Nowicki, G., Barylski, J., Kujawa, N., Gozdzicka-Józefiak, A. 2014. Complete genome
572 sequence of *Lelliottia podophage* pH2B. *Genome Announc.* 2:6:1046.
573
- 574 Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary
575 Biology Centre, Uppsala University.
576
- 577 Patwardhan, A., Ray, S. and Roy, A. 2004. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A
578 Review *J. Phylogen. Evolution. Biol.* 2:2.
579
- 580 Pérombelon, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of pathogenesis.
581 *Plant Pathology*, v. 51, 1-12. 2002.
582
- 583 Pfister P., Hobbie, S., Vicens, Q., Böttger, E.C., and Westhof. E. 2003. The molecular basis for
584 A-site mutations conferring aminoglycoside resistance: relationship between ribosomal
585 susceptibility and X-ray crystal structures. *Chembiochem* 4:1078-1088.
586
- 587 Possuelo, L. G., and Renner, J. D. P. 2015. Caracterização e identificação microbiológica de
588 *Kruyvera* sp. e *Pantoea* sp. *J Infect. Control* 4:2: 52-53
589
- 590 Ronquist, F., Teslenko, M., van de Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B.,
591 Liu, L., Suchard, M. C., and Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian
592 Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space *Syst. Biol.*
593 61:3:539-542.
594
- 595 Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W. and Gardan, L.
596 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al.
597 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya*
598 *chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four
599 novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya*
600 *dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1415–
601 1427.
602
- 603 Silva., A. M. F. 2005. Levantamento da intesidade da podridão-mole da alface e couve-chinesa
604 nas regiões da mata e Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras

- 605 para avaliação da incidência da doença. Master Sciences, Universidade Federal Rural
606 de Pernambuco, UFRPE, Recife.
- 607
- 608 Silva, A. M. F., Mariano, R. L. R., Michereff, S. J., Silveira, E. B., and Medeiros, F. H. V. 2007.
609 Survey of the intensity of soft rot on lettuce and Chinese cabbage in Pernambuco.
610 *Caatinga* 20: 84- 93.
- 611
- 612 Sławiak, M., van Beckhoven, J.R.C.M., Speksnijder, A.G.C.L., Czajkowski, R. Grabe, G.
613 and van der Wolf, J.M. 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade
614 of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe *Eur. J. Plant Pathol.*
615 125:2: 245-261.
- 616
- 617 Somvanshi, V. S., Lang, E., Sträubler, B., Spröer, C., Schumann, P., Ganguly, S., Saxena, A.
618 K., and Stackebrandt. 2006. E. *Providencia vermicola* sp. nov., isolated from infective
619 juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum*. *Int J Syst Evol*
620 *Microbiol.* 56:629-633.
- 621
- 622 Staden, R., Beal, K. F. and Bonfield, J. K. 1998. The Staden Package. *Bioinform. Met. Prot.*
623 132: 384 115-130.
- 624
- 625 Staley, J.T. 2006. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept
626 *Philos. Trans. R. Soc. B.* 361: 1899-1909.
- 627
- 628 Stamatakis, A., Hoover, P., and Rougemont, J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the
629 RaxML web servers *Syst. Biol.* 57:5: 758-771.
- 630
- 631 Stamatakis, A. 2014. RaxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of
632 large phylogenies *Bioinformatics* 30:9:1312-1313.
- 633
- 634 Van der Wolf, E. H., Nijhuius, M. J. Kowalewska, G. S., Saddler, G. S., Parkinson, N.,
635 Elphinstone, J. G. Pritchard, L., Toth, I. K., Lojkowska, E., Potrykus, M., Waleron,
636 M., De Vos, P. Cleenwerck, I., Pirhonen, M., Garland, L., Hélias, V., Pothier, J.
637 F., Pflüger, V., Duffy, B., Tsrör, L., and Manulis, S. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a

- 638 pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*) Int.
639 J. Syst. Evol. Microbiol., 64:768-774.
640
- 641 Waleron M., Waleron, K., Geider, K., and Lojkowska, E. 2008. Application of RFLP analysis
642 of *recA*, *gyrA* and *rpoS* gene fragments for rapid differentiation of *Erwinia*
643 *amylovora* from *Erwinia* strains isolated in Korea and Japan. Eur J Plant
644 Pathol. 121:161–172.
645
646
- 647 Young, J.M., and Park, D.C. 2007. Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on
648 partial *atpD*, *carA*, and *recA* as individual and concatenated nucleotide and peptide
649 sequences Syst. Appl. Microbiol. 30: 343-354.
650
- 651 Zhang, J.X.; Lin, B.R.; Shen, H.F.; Pu, X.M. 2012. First report of bacterial soft rot of potato
652 caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Guangdong, Province
653 of China. Plant Dis. 96: 1109.
654
- 655 Wei, J. F., and Wei, J. H. 2014. First report of bacterial soft rot of konnyaku caused by *Dickeya*
656 *dadantii* in China. Plant Dis. 98:5:682.
657
- 658 Schroeder, B. K., Waters, T. D., and du Toit, L. J. 2010. Evaluation of onion cultivars for
659 resistance to *Enterobacter cloacae* in storage. Plant. Dis. 94: 236-243.
660
- 661 Struve, C. and Krogfelt. 2004. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella*
662 *pneumoniae* isolates Env. Microbiol. 6:584-590.
663
- 664 Struve, C., Bojer, M., and Krogfelt, K., A. 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae*
665 type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and
666 impact on virulence Infect Immun. 76:9:4055-4065.
667
- 668 Waleron, M., Waleron, K., and Lojkowska, E. 2014. Characterization of *Pectobacterium*
669 *carotovorum* subsp. *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. Eur. J. Plant
670 Pathol. 139:457–469.
671

672 van der Wolf, J. M., Nijhuis, E. H., Kowalewska, M. J., Saddler, G. S., Parkinson, N.,
673 Elphinstone, J. G., Pritchard, L., Toth, I. K., Lojkowska, E., Potrykus, M., Waleron, M.,
674 de Vos P., Cleenwerck, I., Pirhonen, M., Garlant, L., Hélias, V., Pothier, J. F., Pflüger,
675 V., Duffy, B., Tsrer, L., and Manulis, S. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic
676 plant pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). Int. J. Syst. Evol.
677 Microbiol. 64:768-74.
678
679

680 **Tabela 1.** Relação de bactérias causadoras de podridão mole, obtidas dos principais municípios produtores de hortaliças de Pernambuco.

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	MESORREGIÃO	HOSPEDEIRO	<i>BLAST</i>			
				16S rDNA %	<i>BLAST MDH</i>	<i>BLAST DNAX</i>	<i>BLAST RPLB</i>
CCRMPCB 3	Camocim de São Félix	Agreste	Brócolis	99-Pcb ^a	99-Pcb	-	-
CCRMPCB15	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	99-Pcc	99-Pcc	-	-
CCRMPCB18	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	100-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMPCB20	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	100-Pa			
CCRMPCB23	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	96-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPCB28	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	100-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPCB31	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	99-Pcb			
CCRMPCB35	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPCB36	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	96-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPCB40	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	100-Mm	-	-	100-Mm
CCRMPCB44	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	99-Pa	99-Pa		
CCRMPCB48	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	99-Pa			
CCRMPCB55	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb			
CCRMPCB56	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMPCB60	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb			
CCRMPCB63	Vitória de Santo Antão	Mata	Rabanete	99-Pcb			
CCRMPCB64	Vitória de Santo Antão	Mata	Rabanete	99-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMPCB66	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMPCB70	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Ec			
CCRMPCB72	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pcb			
CCRMPCB75	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pr			
CCRMPCB77	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb			
CCRMPCB80	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Dz			
CCRMPCB82	Vitória de Santo Antão	Mata	Rabanete	99-Cb			

Tabela 1. Continuação

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	MESORREGIÃO	HOSPEDEIRO	<i>BLAST</i>			
				16S rDNA %	<i>BLAST MDH</i>	<i>BLAST DNAX</i>	<i>BLAST RPLB</i>
CCRMPC84	Vitória de Santo Antão	Mata	Rabanete	100- Pcc	99-Pcc	-	-
CCRMPC92	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pa			
CCRMPC95	Vitória de Santo Antão	Mata	Rabanete	100-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMPC99	Vitória de Santo Antão	Mata	Rabanete	99-Pcc	98-Pcc	-	-
CCRMPC101	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Dz	-	99-Dz	-
CCRMPC102	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pcc			
CCRMPC104	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pa			
CCRMPC106	Chã Grande	Mata	Pimentão	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPC108	Chã Grande	Mata	Pimentão	97-Cf			
CCRMPC109	Chã Grande	Mata	Pimentão	99-Pa			
CCRMPC111	Chã Grande	Mata	Alface	99-Kp			
CCRMPC112	Chã Grande	Mata	Alface	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPC113	Chã Grande	Mata	Alface	100-Pcb			
CCRMPC117	Chã Grande	Mata	Alface	117-Kp			
CCRMPC122	Chã Grande	Mata	Alface	99-Pcb			
CCRMPC124	Chã Grande	Mata	Alface	100-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPC128	Chã Grande	Mata	Alface	99-Pcb			
CCRMPC129	Chã Grande	Mata	Alface	99-Pcb			
CCRMPC131	Chã Grande	Mata	Pimentão	99-Pa			
CCRMPC140	Chã Grande	Mata	Pimentão	99-Pcc			
CCRMPC150	Chã Grande	Mata	Pimentão	99-Dc	-	98-Ds	-
CCRMPC156	Chã Grande	Mata	Pimentão	98-Kg	-	-	99-Kg
CCRMPC157	Chã Grande	Mata	Abobrinha	100-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPC158	Chã Grande	Mata	Abobrinha	100-Pa			

Tabela 1. Continuação

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	MESORREGIÃO	HOSPEDEIRO	<i>BLAST</i>			
				16S rDNA %	<i>BLAST MDH</i>	<i>BLAST DNAX</i>	<i>BLAST RPLB</i>
CCRMSM159	Chã Grande	Mata	Abobrinha	96-Sm			
CCRMPCB162	Chã Grande	Mata	Couve	99-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMPCB168	Chã Grande	Mata	Couve	100-Pcb			
CCRMPA171	Chã Grande	Mata	Abobrinha	100-Pa			
CCRMPA172	Chã Grande	Mata	Abobrinha	99-Pa			
CCRMPA173	Chã Grande	Mata	Abobrinha	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPA174	Chã Grande	Mata	Abobrinha	100-Pa			
CCRMPA178	Chã Grande	Mata	Abobrinha	100-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPCB180	Chã Grande	Mata	Abobrinha	99-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMPCB184	Chã Grande	Mata	Abobrinha	99-Pcb			
CCRMPCB185	Chã Grande	Mata	Abobrinha	100-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMPCB192	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb			
CCRMPCB193	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pcc			
CCRMPCB195	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pa			
CCRMPCB196	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb			
CCRMPCB204	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMDC213	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Dc	-	99-Dc	-
CCRMPCB215	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pcb			
CCRMPCB228	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb			
CCRMKP229	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Kp			
CCRMEEC232	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Ec			
CCRMKO234	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	98-Ko			
CCRMKO249	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Ko			
CCRMDD250	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Dd	-	99-Dd	-

Tabela 1. Continuação

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	MESORREGIÃO	HOSPEDEIRO	<i>BLAST</i>			
				16S rDNA %	<i>BLAST MDH</i>	<i>BLAST DNAX</i>	<i>BLAST RPLB</i>
CCRMDC265	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Dc	-	99-Dc	-
CCRMDC266	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Dc			
CCRMPCB273	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb			
CCRMPCB275	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pcc			
CCRMKO286	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Ko			
CCRMPCB293	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pcb			
CCRMPCB295	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pcb			
CCRMPCB296	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pcc			
CCRMPCB298	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Pcb			
CCRMDD299	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Dd			
CCRMDD300	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	99-Dd			
CCRMPCB313	Garanhuns	Agreste	Alface	99-Pcb			
CCRMPCB317	Garanhuns	Agreste	Alface	100-Pcb			
CCRMPCB341	Garanhuns	Agreste	Alface	100-Pcb			
CCRMPCB347	Garanhuns	Agreste	Alface	99-Pcb			
CCRMPCB350	Garanhuns	Agreste	Alface	98-Pa	99-Pa	-	-
CCRMCF352	Garanhuns	Agreste	Alface	99-Cf			
CCRMPCB361	Garanhuns	Agreste	Alface	99-Pcb			
CCRMPCB362	Garanhuns	Agreste	Alface	100-Pcb			
CCRMPCB368	Garanhuns	Agreste	Tomate	99-Pcc	99-Pcc	-	-
CCRMPCB389	Garanhuns	Agreste	Tomate	99-Pcb			
CCRMPCB392	Garanhuns	Agreste	Tomate	100-Ea			
CCRMPCB394	Bezerros	Agreste	Tomate	99-Ea			
CCRMPCB399	Bezerros	Agreste	Tomate	99-Pcb	99-Pcb	-	-

Tabela 1. Continuação

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	MESORREGIÃO	HOSPEDEIRO	BLAST			
				16S rDNA %	BLAST MDH	BLAST DNAX	BLAST RPLB
CCRMAA402	Bezerros	Agreste	Tomate	98-Ac			
CCRMPA429	Bezerros	Agreste	Pimentão	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPCB454	Bonito	Agreste	Abobrinha	100-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMEC456	Bonito	Agreste	Abobrinha	99-Ec			
CCRMEC477	Bonito	Agreste	Abobrinha	97-Ec			
CCRMEC479	Bonito	Agreste	Abobrinha	96-Ec			
CCRMEC480	Bonito	Agreste	Abobrinha	99-Ec	-	-	98-Ea
CCRMEL485	Bonito	Agreste	Abobrinha	99-Ea			
CCRMPC489	Bonito	Agreste	Abobrinha	99-Pcb			
CCRMEC490	Bonito	Agreste	Abobrinha	99-Ec			
CCRMLA491	Bonito	Agreste	Abobrinha	100-La	-	-	99-La
CCRMPCB494	Bonito	Agreste	Abobrinha	100-Pcb			
CCRMPCB495	Bonito	Agreste	Abobrinha	100-Pcb			
CCRMPCB496	Bonito	Agreste	Abobrinha	96-Pcb			
CCRMPA508	Bonito	Agreste	Abobrinha	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMCF509	Bonito	Agreste	Abobrinha	99-Cf			
CCRMPCB518	Bonito	Agreste	Alface	100-Pcb			
CCRMEC520	Bonito	Agreste	Alface	99-Ec			
CCRMCF524	Bonito	Agreste	alface	98-Cf			
CCRMEL526	Bonito	Agreste	Alface	99-EI	99-Pcc	-	-
CCRMPCB535	Bonito	Agreste	Alface	97-Pcb			
CCRMPCB543	Bonito	Agreste	Alface	98-Pcc			
CCRMKO552	Gravatá	Agreste	Alface	99-Ko			
CCRMPCB558	Gravatá	Agreste	Alface	100-Pcb			

Tabela 1. Continuação

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	MESORREGIÃO	HOSPEDEIRO	<i>BLAST</i>			
				16S rDNA %	<i>BLAST MDH</i>	<i>BLAST DNAX</i>	<i>BLAST RPLB</i>
CCRMPCB585	Gravatá	Agreste	Alface	99-Pcb			
CCRMPCB588	Gravatá	Agreste	Alface	99-Pcb			
CCRMKO592	Gravatá	Agreste	Repolho	99-Ko			
CCRMPCB596	Gravatá	Agreste	Repolho	99-Pcb			
CCRMPCB598	Gravatá	Agreste	Repolho	99-Pcb			
CCRMDZ614	Recife	Metropolitana	Cebola	99-Dz			
CCRMPCB616	Recife	Metropolitana	Cebola	100-Pcb			
CCRMPC617	Recife	Metropolitana	Cebola	100-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPCB588	Gravatá	Agreste	Alface	99-Pcb			
CCRMPC620	Petrolina	Sertão	Acelga	98-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPC621	Petrolina	Sertão	Pimentão	99-Pa			
CCRMPC622	Petrolina	Sertão	Alface	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPC623	Petrolina	Sertão	Abobrinha	100-Pcb	99-Pcb	-	-
CCRMPC624	Petrolina	Sertão	Couve	99-Pa			
CCRMPCB625	Petrolina	Sertão	Couve	99-Pcb			
CCRMPC626	Petrolina	Sertão	Salsa	96-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPCB627	Petrolina	Sertão	Couve	99-Pcb			
CCRMPC628	Petrolina	Sertão	Alface	99-Pcc	99-Pcc	-	-
CCRMPCB629	Petrolina	Sertão	Couve	99-Pcb			
CCRMPC630	Petrolina	Sertão	Beterraba	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPC631	Petrolina	Sertão	Berinjela	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPCB632	Petrolina	Sertão	Beterraba	100-Pcb			
CCRMRA633	Petrolina	Sertão	Coentro	98-Ra	-	-	99-Ri
CCRMPCB634	Petrolina	Sertão	Cebola	100-Pcb			

Tabela 1. Continuação

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	MESORREGIÃO	HOSPEDEIRO	<i>BLAST</i>			
				16S rDNA %	<i>BLAST MDH</i>	<i>BLAST DNAX</i>	<i>BLAST RPLB</i>
CCRMEA635	Petrolina	Sertão	Alface	100-Ea	-	-	98-Ea
CCRMKG636	Petrolina	Sertão	Alface	98-Kg	-	-	99-Kg
CCRMPA637	Petrolina	Sertão	Pimentão	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMDC638	Petrolina	Sertão	Alface	99-Dc	-	98-Dc	-
CCRMPA639	Petrolina	Sertão	Tomate	96-Pa	99-Pa	-	-
CCRMEA640	Petrolina	Sertão	Coentro	99-Ea	-	-	99-Ea
CCRMPA641	Petrolina	Sertão	Alface	99-Pa			
CCRMPCB642	Petrolina	Sertão	Couve	99-Pcb			
CCRMPCB643	Petrolina	Sertão	Rúcula	99-Pcb			
CCRMP644	Petrolina	Sertão	Couve	98-Pcc	99-Pcc	-	-
CCRMPA645	Petrolina	Sertão	Alface	100-Pa			
CCRMPA646	Petrolina	Sertão	Pimentão	99-Pa			
CCRMPA647	Petrolina	Sertão	Beringela	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMDD648	Petrolina	Sertão	Batata	99-Dd	-	99-Dd	-
CCRMKG649	Petrolina	Sertão	Berinjela	99-Kg	-	-	99-Kg
CCRMPA650	Petrolina	Sertão	Batata	100-Pa			
CCRMPCB651	Petrolina	Sertão	Couve	100-Pcb			
CCRMPA652	Petrolina	Sertão	Alface	99-Pa			
CCRMDC654	Petrolina	Sertão	Pimentão	98-Dc	-	98-Dd	-
CCRMPA655	Petrolina	Sertão	Pimentão	99-Pa			
CCRMPCB656	Petrolina	Sertão	Couve	99-Pcb			
CCRMPA657	Petrolina	Sertão	Alface	100-Pa			
CCRMPA658	Petrolina	Sertão	Pimentão	99-Pa			
CCRMRT660	Petrolina	Sertão	Alface	98-Rt	-	-	99-Rt

Tabela 1. Continuação

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	MESORREGIÃO	HOSPEDEIRO	BLAST			
				16S rDNA %	BLAST MDH	BLAST DNAX	BLAST RPLB
CCRMPA666	Petrolina	Sertão	Melão	99-Pa	99-Pa	-	-
CCRMPA670	Petrolina	Sertão	Pimentão	99-Pa			
CCRMRT671	Mocoto	Agreste	Alface	98-Rt	-	-	99-Rt
CCRMPCB672	Petrolina	Sertão	Couve	100-Pcb			

681 ^a *Acetobacter aceti* (Ac); *Citrobacter braakii* (Cb); *Citrobacter freundii* (Cf); *D.chrysanthemi* (Dc); *Dickeya dadantii* (Dd); *Enterobacter asburiae* (Ea);
682 *Enterobacter cloacae* (Ec); *Enterobacter ludwigii* (El); *Klebsiella oxytoca* (Ko); *Kluyvera georgiana* (Kg); *Klebsiella pneumoniae* (Kp); *Leliotia amnigena* (La);
683 *Morganella morganii* (Mm) *Pantoeae* sp. (Ps); *Pectobacterium aroidearum* (Pa); *P.carotovorum* subsp.*actinidae* (Pca); *Pectobacterium carotovorum* subsp.
684 *brasiliense* (Pcb); *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc); *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* (Pco); *Providencia rettgeri* (Pr);
685 *Rahnella aquatilis* (Ra); *Raottella terrigena* (Rt) e *Serratia macerans* (Sm).

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701 **Tabela 2.** *Primers* utilizados na amplificação de fragmentos de genes envolvidos na análise de sequência multilocus

NOME COMPLETO	GENE	SEQUÊNCIA	TAMANHO DA SEQUÊNCIA (PB)	REFERÊNCIA
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase subunidade alfa	gapA326F	ATCTTCCTGACCGACGAAACTGC	450	Ma et al. 2007
	gapA845R	ACGTCATCTTCGGTGTAACCCAG		
Malato desidrogenase	mdh86F	CCCAGCTTCCTTCAGGTTTCAGA	460	Ma et al. 2007
	mdh628R	CTGCATTCTGAATACGTTTGGTCA		
Isocitrato desidrogenase, específico para NADP+	icdA400F	GGTGGTATCCGTTCTCTGAACG	520	Ma et al. 2007
	icdA977R	TAGTCGCCGTTTCAGGTTTCATACA		
Gama glutamil fostato redutase	proAF1	CGGYAATGCGGTGATTCTGCG	630	Ma et al. 2007
	proAR1	GGGTACTGACCGCCACTTC		
Dna polimerase III subunidade tau e gama	dnaxf	TATCAGGTYCTTGCCCGTAAGTCC	403	Sławiak et al. 2009
	dnaxr	TCGACATCCARCGCYTTGAGATG		
Recombinase alfa	recAf	GGTAAAGGGTCTATCATGGG	730	Warelton et al. 2002
	recAr	CCTTCACCATAACATAATTTGGA		
Fator de alongação G	fusAf	CACCGGTGTGAACCACAAAA	314	van der Wolf et al. 2014
	fusAr	TAGCCTTTCGGATTTGAGCC		
50S ribossomal subunidade L2	rplbf	TTACGMCTGAGCTGCACAAGG	349	van der Wolf et al. 2014
	rplbr	GCGGCGTACGATGAATTTATC		
RNA polimerase, fator sigma S - sigma 38	rpoSf	ATGAGCCAAAGTACGCTGAA	843	Warelton et al. 2002
	rpoSr	ACCTGAATCTGACGAACACG		
Girase alfa	gyrAf	AAATCGGCCCGCCGYATMAA	489	Warelton et al. 2002
	gyrAr	TCCACCGGTTTCAGCVACRCG		

702

703

704

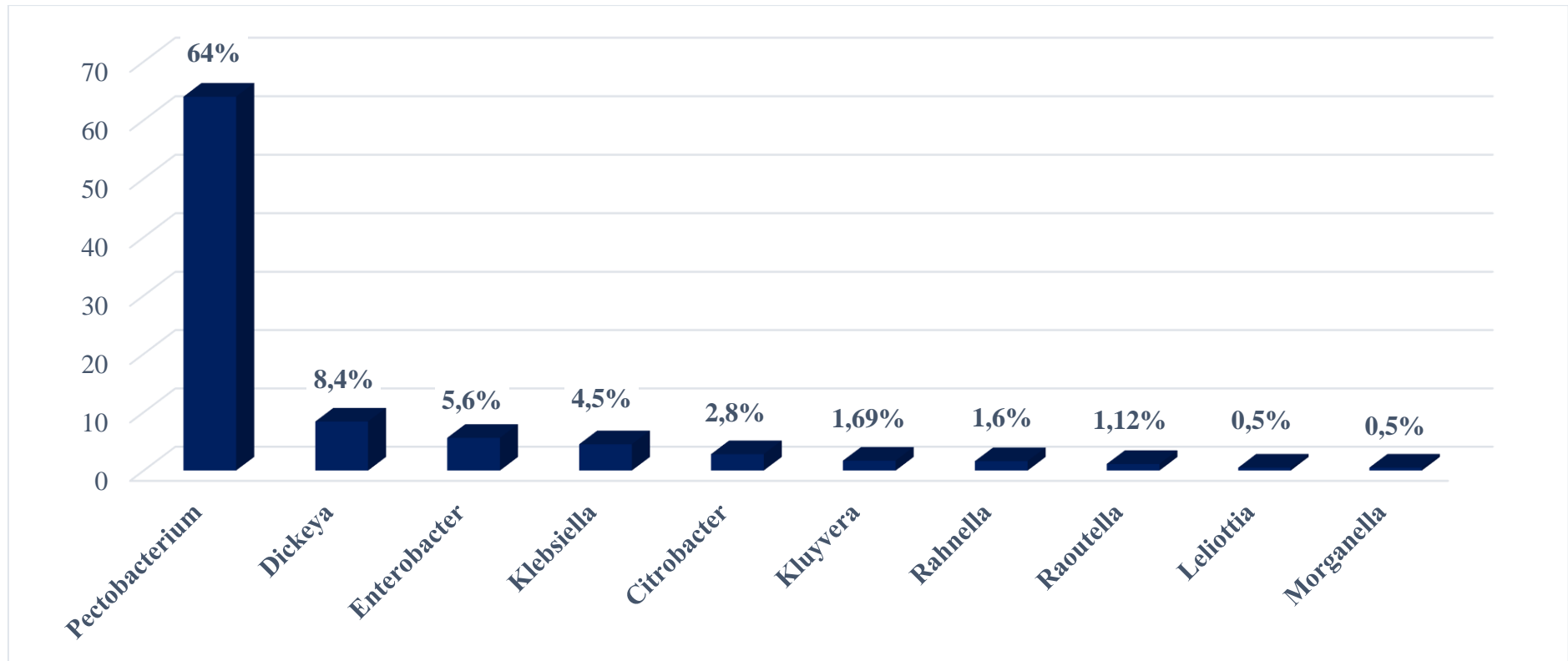
705 **Tabela 3.** Sequências parciais dos genes *gapA*, *icdA*, *mdh*, *recA*, *proA*, *dnaX*, *fusA*, *gyrA*, *rplB* e *rpoS* de isolados de enterobactérias obtidos no GenBank.

CÓDIGOS	NOME DA ESPECIE	GAPA	ICDA	MDH	RECA	PROA	DNAX	FUSA	GYRA	RPLB	RPOS
KC20	<i>Pectobacterium aroidearum</i>	MF443742	MF443747	MF443744.1	-	MF443743.1	-	-	-	-	-
SCRI1043	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	EU340587	EF550736.1	EF550788	BX950851	EF550945.1	-	-	-	-	-
CFBP1526*	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	JN600350.1	JN600339	JN600342.1	DQ523478.1	KCQ16512	-	-	-	-	-
IBSBF1692*	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	EF550681.1	EF550734.1	EF550786.1	KU510128.1	EF550943.1	-	-	-	-	-
	subsp <i>brasiliensis</i>										
ATCC15713*	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	CP001657	CP001657	CP001657	CP001657	CP001657	-	-	-	-	-
	subsp <i>carotovorum</i>										
SCRI482	<i>Pectobacterium odorierum</i>	EU340589	EU340589	EU340589	EU340589	EU340589	-	-	-	-	-
ATCC43762*	<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	FJ895843	FJ895844	FJ895845	FJ217089	FJ895847	-	-	-	-	-
CFBP8475*	<i>Pectobacterium pamentieri</i>	CP015749	CP015749	CP015749	CP015749	CP015749	-	-	-	-	-
ATCC 43316	<i>P. wasabiae</i>	FJ895855	FJ895856	FJ895857	DQ859798	FJ895859	-	-	-	-	-
NCPPB4580*	<i>Dickeya aquatica</i>	-	-	-	KT992696	-	KT992716	KT992700	KY231141	KT992712	KY283824
CFBP2048*	<i>Dickeya chrisanthemi</i>	-	-	-	KC844651	-	FJ895859	KC844543	KC844597	KC844678	KC844705
CFBP1269*	<i>Dickeya dadantii</i> subsp. <i>dadantii</i>	-	-	-	KC844652	-	JX434940	KC844544	KC844598	KC844679	KC844706
	<i>Dickeya dadantii</i> subsp.										
ICMP1568*	<i>dieffenbachiae</i>	-	-	-	KC844655	-	KC844493	KC844547	KC844601	KC844682	KC844709
CFBP1200	<i>Dickeya dianthicola</i>	-	-	-	NZ_CM001841	-	JX434942	KC844540	KC844594	KC844675	KC844702
JS5*	<i>Dickeya fangzhongdai</i>	-	-	-	KT992693	-	KT992713	KT992697	CP025003	KT992709	CP025003
CFBP3699	<i>Dickeya paradisiaca</i>	-	-	-	KC844657	-	KC844493	KC844549	KC844603	KC844684	KC844711
IPO2222*	<i>Dickeya solani</i>	-	-	-	NZ_CP015137	-	NZ_CP015137	NZ_CP015137	NZ_CP015137	NZ_CP015137	NZ_CP015137
IPO2276	<i>Dickeya solani</i>	-	-	-	KC844663	-	KC844501	KC844555	KC844609	KC844636	KC844690
CFBP2052*	<i>Dickeya zeae</i>	-	-	-	FJ216967	-	KC844502	KC844550	KC844604	KC844685	KC844712
ATCC35953*	<i>Enterobacter asburiae</i>	CP011863	CP011863	CP011863	-	CP011863	CP011863	-	-	CP011863	-
DSM29888*	<i>Enterobacter bugandensis</i>	NZ_FYBI01000044	NZ_POUR01000001	NZ_FYBI01000014	-	NZ_FYBI01000050	LEDRO1000020	-	-	NZ_FYBI01000053	-
CFBP416*	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	JRUP01000008	JRUP01000018	GG704865	-	NZ_POUR01000001	CP025225	-	-	GG704865	-
ATCC13047*	<i>Enterobacter cloacae</i>	CP017475	CP011798	CP017475	-	CP017475	CP017475	-	-	CP017475	-
ATCC23373*	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	LVUS01000012	LEDRO1000002	LVUS01000045	-	CP003678	LEDRO1000020	-	-	CP003678	-
ATCC49162*	<i>Enterobacter hormaechei</i>	CP011662	CP011662	CP011662	-	NIBR01000001	NIBR01000001	-	-	CP011662	-
CIP103441*	<i>E.hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	NZ_MKEQ01000001	NZ_CP010377	CP010377	-	NZ_CP010377	MKEQ01000001	-	-	CP010377	-

Tabela 3. Continuação

COLEÇÃO	NOME DA ESPECIE	<i>gapA</i>	<i>icdA</i>	<i>mdh</i>	<i>recA</i>	<i>proA</i>	<i>dnaX</i>	<i>fusA</i>	<i>gyrA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoS</i>
	<i>E.hormaechei</i> subsp.										
ATCC23373*	<i>steigerwaltii</i>	CP012167	CP012167	CP012167	-	CP012167	CP012167	-	-	CP012167	-
ATCCBAA260*	<i>Enterobacter kobei</i>	MKEQ01000001	CP017181	FKLS01000001	-	NZ_HE578949	CP017181	-	-	FKLS01000001	-
DSM16688*	<i>Enterobacter ludwigii</i>	JTLO01000001	JTLO01000001	JTLO01000001	-	JTLO01000001	JTLO01000001	-	-	JTLO01000001	-
DSM26120*	<i>Enterobacter massiliensis</i>	NZ_HE578945	NZ_HE578949	NZ_HE578946	-	NZ_HE578949	NZ_HE578949	-	-	NZ_HE578948	-
LMG25706*	<i>Enterobacter mori</i>	NFZM01000027	NFZM01000008	NZ_GL890780	-	NFZM01000014	NFZM01000009	-	-	NFZM01000085	-
LMG28480*	<i>Enterobacter muelleri</i>	NZ_FXLQ01000062	NZ_FXLQ01000034	NZ_FXLQ01000010	-	NZ_FXLQ01000034	NZ_FXLQ01000034	-	-	NZ_FXLQ01000039	-
LMG27195*	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	LSTS01000020	NZ_FYBF01000064	LSTS01000020	-	NZ_FYBF01000064	NZ_FYBF01000064	-	-	CP017183	-
ATCC13182*	<i>Klebsiella michiganensis</i>	CP008841	CP008841	CP008841	-	CP008841	CP008841	-	-	CP008841	-
ATCC13182*	<i>Klebsiella oxytca</i>	CP011636	CP011636	CP011636	-	CP011636	CP011636	-	-	CP011636	-
ATCC13883*	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FO834906	FO834906	FO834906	-	FO834906	FO834906	-	-	FO834906	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.										
LMG3113*	<i>ozaena</i>	KU510247	NZ_JULI01000157	NZ_JULI01000157	-	NZ_JULI01000157	NZ_JULI01000157	-	-	NZ_JULI01000157	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.										
LMG2095*	<i>pneumoniae</i>	CP009208	CP009208	CP009208	-	CP009208	CP009208	-	-	CP009208	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.										
LMG3184*	<i>rhinoscleromatis</i>	FO203501	FO203501	FO203501	-	FO203501	FO203501	-	-	FO203501	-
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>										
DSM28211*	subsp. <i>quasipneumoniae</i>	CP014156	CP014156	CP014156	-	CP014156	CP014156	-	-	CP014156	-
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>										
DSM28212*	subsp. <i>similipneumoniae</i>	HG933782	FKLR01000045	CBZR010000026	-	FKLR01000045	FKLR01000045	-	-	FKLR01000008	-
ATCCBAA830*	<i>Klebsiella varicola</i>	HG933780	KQ089631	KQ089631	-	KQ089631	CXOY01000005	-	-	FLLH01000012	-
ATCC25830*	<i>Morganella morganii</i>	NZ_CP025933	NZ_CP025933	NZ_CP025933	-	NZ_CP025933	NZ_CP025933	-	-	NZ_CP025933	-
	<i>Morganella morganella</i> subsp.										
ATCC49948*	<i>sibonii</i>	NZ_PDLE01000004	NZ_PDLE01000004	NZ_PDLE01000004	-	NZ_PDLE01000004	NZ_PDLE01000004	-	-	NZ_PDLE01000004	-
LMG23374*	<i>Morganella psychrotolerans</i>	NZ_PDLE01000004	NZ_LZEW01000001	NZ_LZEY01000061	-	NZ_LZEW01000023	-	-	-	LZEY01000018	-
JCM 16940*	<i>Providencia burhodogranaria</i>	KB233222	KB233222	KB233222	-	KB233222	KB233222	-	-	KB233222	-
ATCC33673*	<i>Providencia rustigianii</i>	GG703817	GG703819	NZ_GG703818	-	ABXV02000042	GG703819	-	-	GG703823	-
ATCC29914*	<i>Providencia stuartii</i>	CP008920	CP008920	CP008920	-	CP008920	CP008920	-	-	CP008920	-
LMG27717*	<i>Rahnella victoriana</i>	NZ_MAEN01000001	NZ_MAEN01000001	NZ_MAEN01000001	-	NZ_MAEN01000001	NZ_MAEN01000001	-	-	NZ_MAEN01000001	-
ATCC31898*	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	CP010557	CP010557	CP010557	-	CP010557	CP010557	-	-	CP010557	-
ATCC33531*	<i>Raoultella planticola</i>	CP023877	CP023877	CP023877	-	CP023877	CP023877	-	-	CP023877	-

724



725

726

727

Fig. 1. Identificação por meios da região 16S rDNA da coleção de 177 isolados oriundas de hortaliças com sintoma de podridão mole das mesorregiões da Zona da mata, Agreste e Sertão de Pernambuco.

728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768

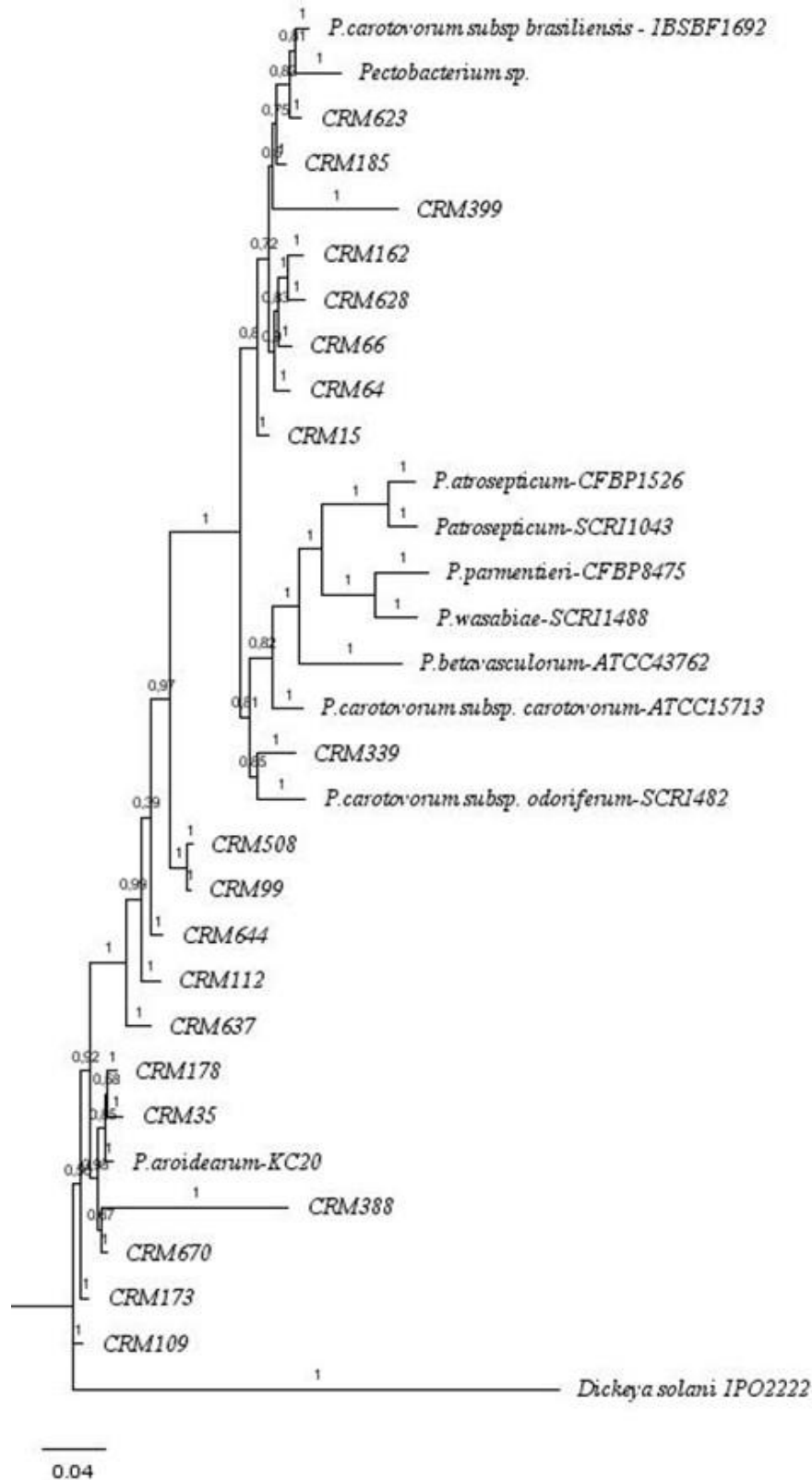


Fig. 2. Árvore filogenética construída por meio de Inferência Baysiana a partir das seqüências parciais dos genes *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA*, e *recA*. O posicionamento dos isolados obtidos no presente estudo no gênero *Pectobacterium* é mostrado. A barra indica o número de substituições por sítio. Os valores dos ramos indicam valores de probabilidade posterior.

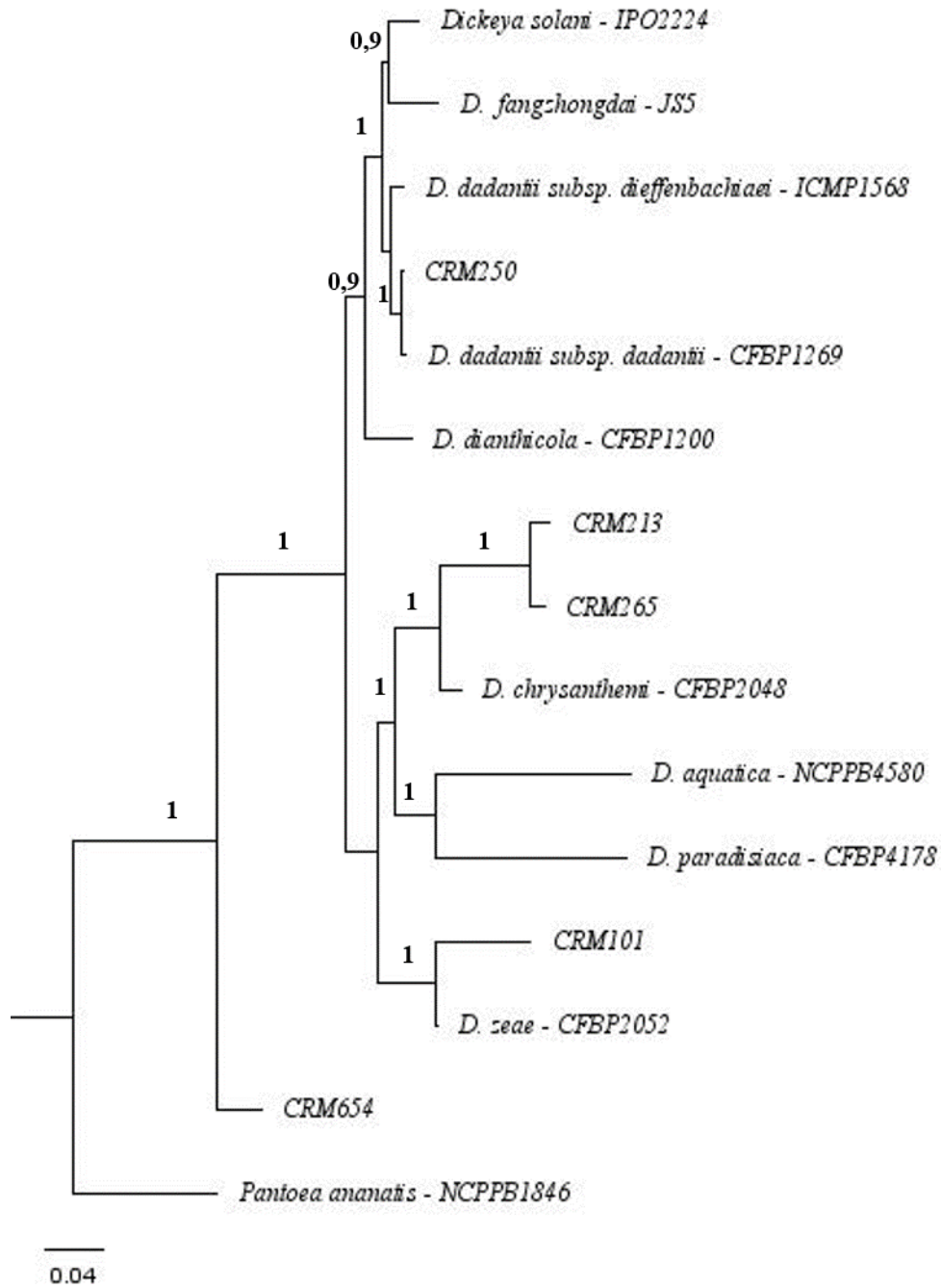


Fig. 3. Árvore filogenética construída por meio de Inferência Baysiana a partir das sequências parciais dos genes *dnaX*, *fusA*, *gyrA*, *recA*, *rplB* e *rpoS*. O posicionamento dos isolados obtidos no presente estudo no gênero *Dickeya* é mostrado. A barra indica o número de substituições por sítio. Os valores dos ramos indicam valores de probabilidade posterior.

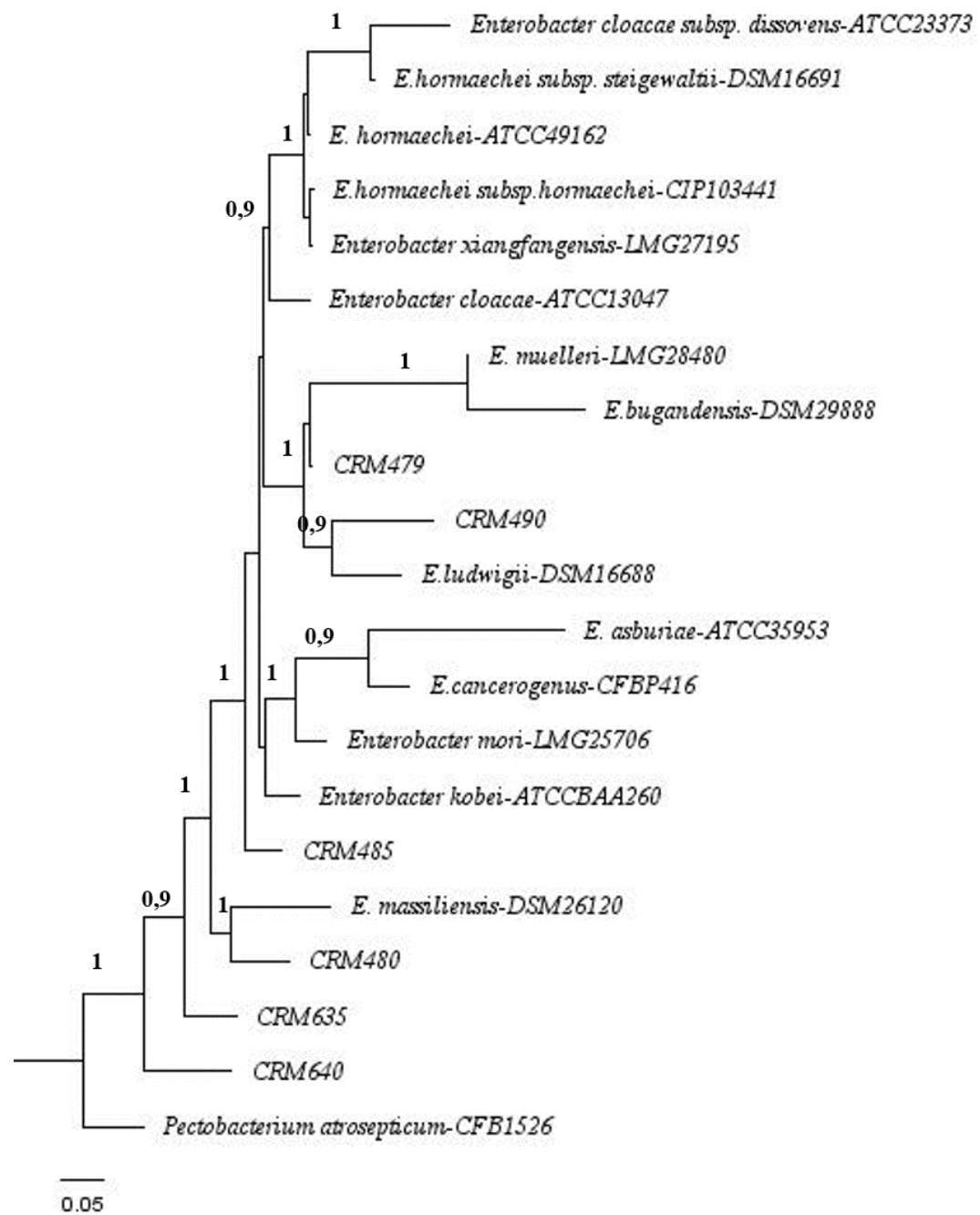


Fig. 4. Árvore filogenética construída por meio de inferência Baysiana a partir das sequências parciais dos genes *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA* e *rplB*. O posicionamento dos isolados obtidos no presente estudo no gênero *Enterobacter* é mostrado. A barra indica o número de substituições por sítio. Os valores dos ramos indicam valores de probabilidade posterior.

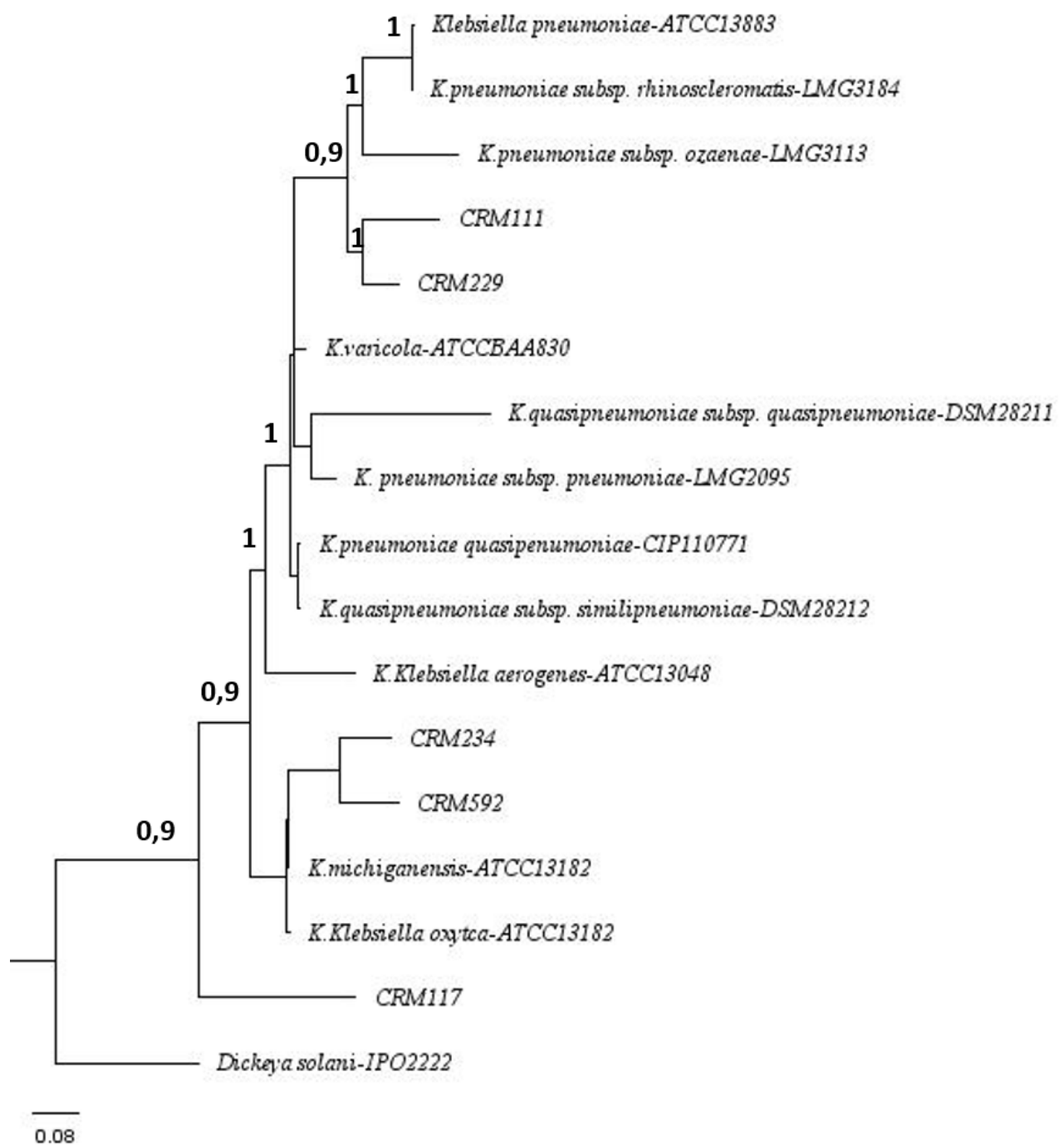
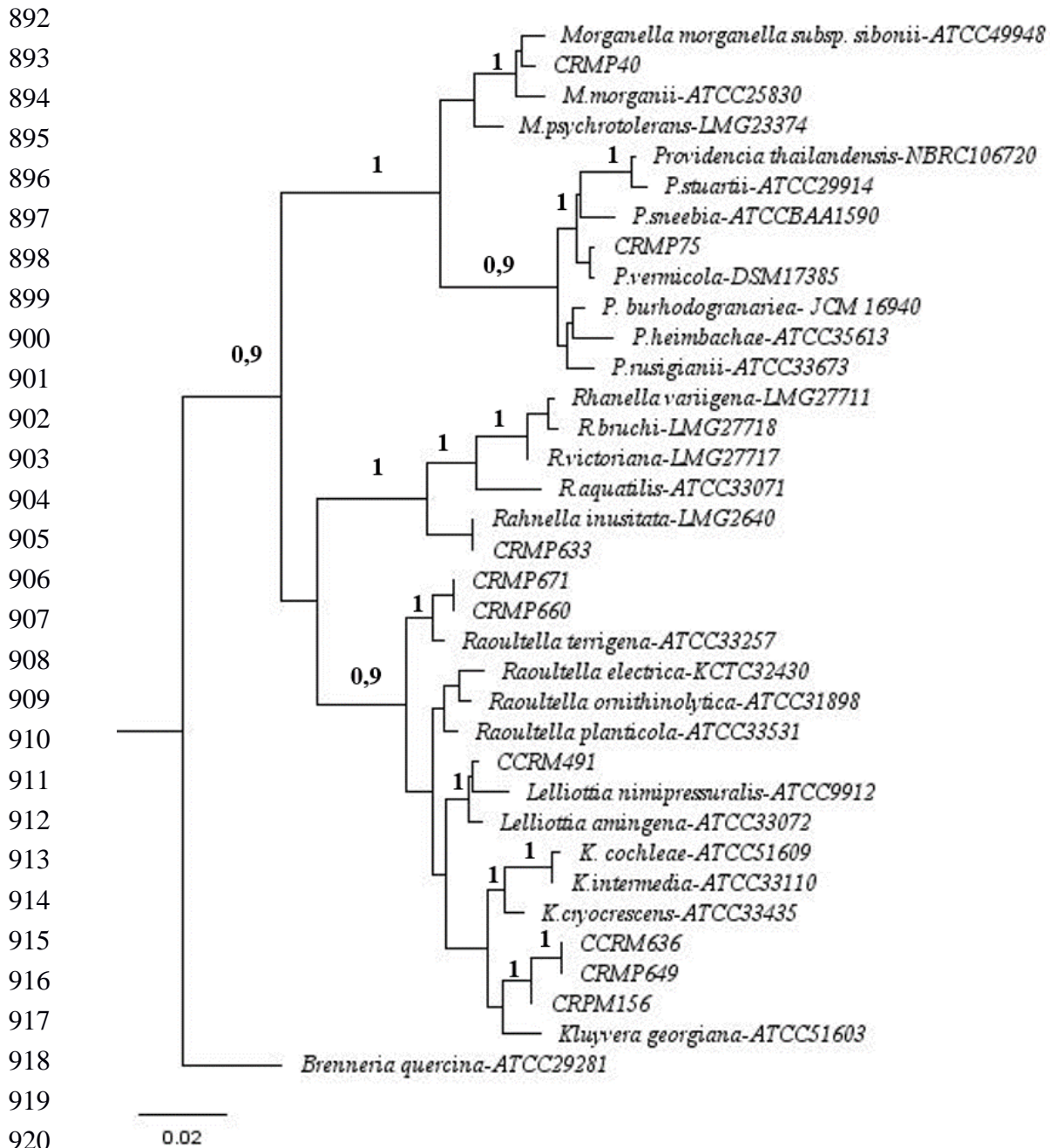


Fig. 5. Árvore filogenética construída por meio de Inferência Baysiana a partir das sequências parciais dos genes *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA* e *rplB*. O posicionamento dos isolados obtidos no presente estudo no gênero *Klebsiella* é mostrado. A barra indica o número de substituições por sítio. Os valores dos ramos indicam valores de probabilidade posterior.



921 **Fig. 6.** Árvore filogenética construída por meio de Inferência Baysiana a partir das sequências parciais
 922 dos genes *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *proA*, e *rplB*. O posicionamento dos isolados obtidos no presente estudo
 923 dos gêneros de *Morganella*, *Kluyvera*, *Providencia*, *Rahnella* e *Raoultella* é mostrado. A barra indica o
 924 número de substituições por sítio. Os valores dos ramos indicam valores de probabilidade posterior.

CAPÍTULO III

**FIRST REPORT OF *Pectobacterium aroidearum* AND *Pectobacterium carotovorum*
SUBSP. *brasiliensis* CAUSING SOFT ROT OF *CUCURBITA PEPO* L. IN BRAZIL**

Plant Disease Note



APS Journals

The premier source for peer-reviewed plant pathology research since 1911.

[Journals Home](#)
[Books Home](#)
[APS Home](#)
[IS-MPMI Home](#)
[My Profile](#)
[Subscribe](#)
[Search](#)
[Advanced Search](#)
[Help](#)
[Share](#)
[Subscribe](#)
[Free alerts](#)
[RSS](#)


About the cover for February 2017

ISSN: 0191-2917
e-ISSN: 1943-7692

SEARCH

 MPMI

 Phytobiomes

 Phytopathology

 Plant Disease

[Advanced Search](#)

Resources

Subscribe

About Plant Disease

First Look

Most Downloaded Articles

Journals Impact

Submit a Manuscript

Customer Care

About My Password

Rights and Permissions

Plagiarism and Ethics

Advertise

Crossref

Open Access

ORCID Registry

plant disease

Editor-in-Chief: Alison E. Robertson

Published by The American Phytopathological Society

[Home](#) > [Plant Disease](#) > [Table of Contents](#) > [Full Text HTML](#)

[Previous Article](#) | [Next Article](#)

February 2017, Volume 101, Number 2

Page 379

<https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1168-PDN>

DISEASE NOTES

First Report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Causing Soft Rot of *Cucurbita pepo* in Brazil

A. J. G. Moraes, E. B. Souza, R. L. R. Mariano, A. M. F. Silva, and N. B. Lima, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; A. R. Peixoto, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, 48900-000, Bahia, Brazil; and M. A. S. Gama, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil.

Citation

Open Access.

Over the last few years, the appreciation of zucchini (*Cucurbita pepo*) has been growing due to its nutritional value and contribution to human health. In Brazil, it is among the 10 highest vegetables in economic value and production. During 2015, high incidence (about 80%) of soft rot was observed in green and ripe fruits of zucchini (var. Caserta) in a plantation located in Chã Grande County (8.2542472°S, 35.495197°W), Pernambuco State, Brazil. Soft rot symptoms in zucchini were water soaking and macerating of fruit. Samples were collected from zucchini fields and bacteria were selectively isolated by transferring rot tissue to a healthy pepper fruit using a sterilized toothpick (Takatsu et al. 1981). After 24 h incubation in moist chamber, bacteria were directly transferred from lesions to petri dishes containing CPG medium (peptone-casamino acid-glucose). In this medium, young colonies (24 h) of pectobacteria showed "broken glass" aspect when observed in stereoscope under oblique lighting. Bacterial strains CRMP1 to CRMP7 were tested for pathogenicity in fruits of pepper and zucchini, and potato tubers, six of each host for each strain, by injection of 10 µl of cell suspension (10⁷ CFU/ml). After 24 to 48 h incubation in a moist chamber at 28°C, typical symptoms of soft rot were observed and strains were reisolated successfully from symptomatic zucchini fruits to complete Koch's postulates. The strains were stored at the Coleção de Culturas Rosa Mariano of the Laboratório de Fitobacteriologia at the Universidade Federal Rural de Pernambuco. The controls remained symptomless. The Biolog Gen III System identified all strains as belonging to the genus *Pectobacterium*. The molecular identification was performed from the sequencing of a 1,238-bp fragment of 16S rRNA (Darrasse et al. 1994). BLASTn analysis of 16S rDNA showed the sequences of strains CRMP1 to CRMP4 (GenBank KX096060 to 63) shared 99.9% similarity to strain LMG2417 (JN600324.1) of *P.*

Quick Links

Add to favorites

E-mail to a colleague

Alert me when new articles cite this article

Download to citation manager

Related articles found in APS Journals

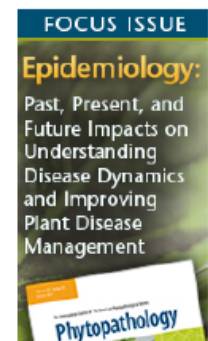
Article History

Issue Date: 13 Jan 2017

Published: 21 Nov 2016

First Look: 24 Oct 2016

Accepted: 17 Oct 2016



05/04/2018

First Report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Causing Soft Rot of Cucurbita pep...

aroidearum and the sequences of strains CRMP5 to CRMP7 (KX096064 to 66) shared 99.9% similarity to strain 8 (JF926723.1) of *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Phylogenetic analysis of 16S rDNA performed by Bayesian inference analysis between the sequences of these seven strains and sequences of species and subspecies of *Pectobacterium* from GenBank grouped strains CRMP1 to CRMP4 with *P. aroidearum* (LMG2417) with a posterior probability of 100% and strains CRMP5 to CRMP7 with *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (strain 8) with a posterior probability of 99%. ERIC and BOX-PCR analyzes performed with type strains of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (IBSBF863), *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (CRMP36), *P. atrosepticum* (IBSBF1819), and *Dickeya chrysanthemi* (IBSBF231) showed strains CRMP1 to CRMP4 formed a distinct group, while CRMP5 to CRMP7 grouped with *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (CRMP36) at 70% similarity level. This report evidenced the expansion of the known host range for *P. aroidearum* (Nabhan et al. 2013) and *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* and sheds light on the diversity of pectobacteria in Brazil, which is little studied. To our knowledge, this is the first report of soft rot caused by *P. aroidearum* and *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* on zucchini in Brazil and also of *P. aroidearum* in Brazilian territory.



References:

Section:

-
- Darrasse, A.,** et al. 1994. Appl. Environ. Microbiol. 60:1437. [ISI]
Nabhan, S., et al. 2013. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:2520.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.046011-0> [Crossref] [ISI]
Takatsu, A., et al. 1981. Fitopatol. Bras. 6:550.

--
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80

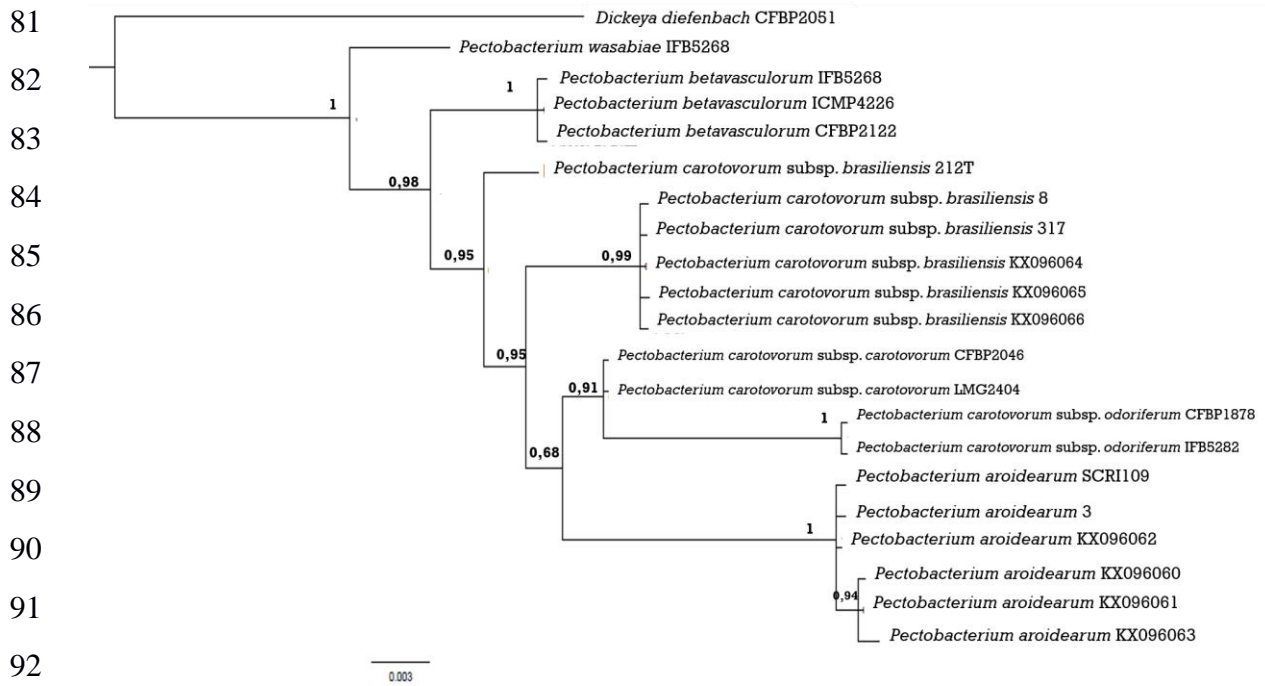


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed by means of Bayesian Inference from the partial sequences of the 16s rDNA gene. The positioning of the isolates obtained in the present study of the genus *Pectobacterium* is shown. The values of the branches indicate posterior probability.

CAPÍTULO IV

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* OBTIDA DE HORTALIÇAS CULTIVADAS EM DIFERENTES ZONAS CLIMÁTICAS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

Plant Disease

1 **Estrutura genética de populações de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis***
2 **obtidas de hortaliças cultivadas em diferentes zonas climáticas no estado de**
3 **Pernambuco, Brasil**
4

5 **Alessandra J. G. Moraes e Rosa L. R. Mariano**, Departamento de Agronomia, Universidade
6 Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil; **E. B. Souza**,
7 Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900,
8 Pernambuco, Brasil; **Valdir Q. Balbino**, Departamento de Biologia, Universidade Federal de
9 Pernambuco, Recife, 50670-901, Pernambuco, Brasil; **A. M. F. Silva, B. Ribeiro, C. C. Souza**
10 e **M. A. S. Gama**,[†] Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
11 Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.
12
13

14 **Resumo**

15 A podridão mole é uma doença de ocorrência generalizada, responsável por causar perdas em
16 diversas culturas olerícolas no Brasil e no mundo. Uma coleção de isolados de *Pectobacterium*
17 *carotovorum* subsp. *brasiliensis* oriundos de diferentes zonas climáticas do estado de
18 Pernambuco (Zona da Mata, Agreste e Sertão) foi formada para analisar a estrutura
19 populacional dessa bactéria. Todos os isolados (64) foram identificados por meio de
20 sequenciamentos da região 16S rDNA, do gene *mdh* e *primers* específicos Br1/f1, como *P.*
21 *carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Com base no marcador REP-PCR, a população dessa bactéria
22 apresentou alta variabilidade, elevada riqueza de haplótipos e alta diversidade genética. Foram
23 observadas evidências de baixo fluxo gênico entre as subpopulações da mata, Agreste e Sertão.
24 A ausência de recombinação nas subpopulações indica que este não foi o principal mecanismo
25 gerador de variabilidade na subespécie estudada. A maior variação estimada pela análise de
26 variância molecular foi observada dentro das subpopulações. A população total não apresentou
27 estruturação genética, pois diversos *locos* foram compartilhados, evidenciando que as
28 subpopulações se apresentaram intimamente relacionadas, independente da zona climática.
29 Para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que analisou a estrutura genética de
30 populações de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* no estado de Pernambuco.

[†] Autor para correspondência: Marco A.S. Gama;
E-mail: marco.gama@ufrpe.br

Abstract

31
32 Soft rot is a widespread disease responsible for causing losses in various vegetables in Brazil
33 and worldwide. A collection of isolates of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*
34 from different climatic zones of the state of Pernambuco (forest, intermediary and semiarid)
35 was assembled for population structure analysis of this bacterium. All isolates (64) were
36 identified as *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* using 16S rDNA and *mdh* gene sequencing and
37 with specific *primers* Br1/f1. Based on the REP-PCR marker, the population of this bacterium
38 showed high variability, high haplotype richness and high genetic diversity. Evidence of low
39 gene flow was observed between subpopulations of the forest, intermediary and semiarid.
40 Absence of recombination in the subpopulations indicated that this was not the main mechanism
41 generating variability in the subspecies studied. The greater variation estimated by analysis of
42 molecular variance was observed within the subpopulations. The total population did not
43 present genetic structuration, since several loci were shared, evidencing that subpopulations
44 were closely related, independently of the climatic zone. To our knowledge, this was the first
45 study that analyzed the genetic structure of populations of *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*
46 in the state of Pernambuco.

47
48
49
50 A podridão mole é uma doença de ocorrência comum no Brasil e no mundo, sendo
51 responsável por perdas significativas na produção de diversas culturas (Dess et al. 2017; Lee et
52 al. 2015). No estado de Pernambuco essa doença é considerada um sério problema para a
53 produção de hortaliças, principalmente em alface e couve chinesa, as quais são suscetíveis a
54 essa doença (Alvarado et al. 2011; Félix et al. 2014; Silva et al. 2007).

55 A doença pode ser causada por diferentes espécies dos gêneros *Pectobacterium* e
56 *Dickeya*, destacando-se *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, a qual apresentou-se
57 distribuída na mesorregião da mata, Agreste e Sertão de Pernambuco (Moraes et al. 2018). Essa
58 bactéria foi isolada pela primeira vez a partir de plantas de batata com sintomas de canela preta
59 no Brasil (Duarte et al. 2004) e, desde então, tem sido relatada em diversos países (Choi e Kim.
60 2013; De Boer et al. 2012; Kim et al. 2009) e em associação com diversas espécies de plantas
61 (Lee et al. 2014; Pitman et al. 2008; van der Merwe et al. 2010).

62 O conhecimento sobre a diversidade é um importante pré-requisito para o
63 desenvolvimento de métodos de identificação e detecção de fitobactérias, bem como para

64 estudos epidemiológicos e desenvolvimento de estratégias para o manejo de fitobacterioses
65 (Tasssa e Duarte, 2005).

66 O estudo sobre a estrutura genética de populações de fitopatógenos é uma importante
67 ferramenta para compreensão da biologia populacional de microrganismos (Milgron 2015).
68 Nesse sentido, esses estudos podem ser usados para estimar o impacto relativo das diferentes
69 forças evolutivas (seleção, mutação, deriva, fluxo gênico e recombinação) que influenciam a
70 população de patógenos (McDonald e Linde 2002). Dentro da estrutura genética é fundamental
71 diferenciar dois tipos de diversidade: diversidade gênica e genotípica. A diversidade gênica é
72 um índice calculado em função do número e frequências de alelos em um único loco, enquanto
73 a diversidade genotípica refere-se ao número de indivíduos geneticamente distintos na
74 população (Grünwald et al. 2003).

75 Diversos marcadores podem ser utilizados como ferramenta para descrever padrões de
76 variabilidade genética de uma população natural e avaliar de que forma a variabilidade se
77 encontra distribuída (Telles et al. 2003). Dentre os marcadores empregados no estudo da
78 diversidade genética de *Pectobacterium* spp. destacam-se RFLP, RAPD, ISSR e rep-PCR como
79 os mais utilizados (Gallelli et al. 2009; Toth et al. 1999; Dana et al. 2015; Faquih et al. 2015).
80 Desses marcadores, rep-PCR (REP, ERIC e BOX) apresenta-se como uma técnica capaz de
81 gerar perfis genômicos de DNA com base na amplificação de regiões localizadas entre
82 sequências repetitivas, caracterizando-se como uma técnica extremamente confiável,
83 reprodutível, rápida e altamente discriminatória (Louws et al., 1996; Versalovic et al., 1994).

84 Levando-se em consideração a prevalência de isolados de *P. carotovorum* subsp.
85 *brasiliensis* em diferentes zonas climáticas do estado de Pernambuco (Moraes 2018), o
86 conhecimento sobre a variabilidade genética de isolados dessa bactéria e de como essa
87 variabilidade pode ser afetada por mecanismos evolutivos, torna-se essencial para otimização
88 de estratégias de controle da podridão mole, particularmente no desenvolvimento de cultivares
89 resistentes (McDonald e Linde 2002). No entanto, como estudos de estrutura genética de
90 populações deste fitopatógeno são inexistentes, o presente trabalho utilizou a técnica de rep-
91 PCR e descritores da diversidade genética para analisar a estrutura das populações de *P.*
92 *carotovorum* subsp. *brasiliensis* causando infecção em hortaliças nas diferentes zonas
93 climáticas do estado de Pernambuco.

94

95 **Materiais e Métodos**

96 **Isolados bacterianos.** Sessenta e quatro isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*
97 foram obtidos de diversas hortaliças com sintomas de podridão mole provenientes de áreas de

98 plantio localizadas nas mesorregiões da Zona da Mata (Vitória de Santo Antão e Chã grande),
99 Agreste (Camocim de São Félix, Garanhuns, Bonito, Gravatá e Bezerros) e Sertão (Petrolina)
100 do estado de Pernambuco, Brasil (Fig.1). A mesorregião da mata apresenta umidade variando
101 de 30 a 100% com níveis de precipitação podendo ultrapassar 2500 mm e temperaturas de 15 a
102 36°C. Na mesorregião do Agreste, a umidade varia entre 10 e 100% e precipitação de 300 a
103 1200 mm com temperaturas mais amenas, variando de 15 a 32°C. Por sua vez, na mesorregião
104 do Sertão, a umidade varia de 5 a 90%, com precipitação entre 400 e 800 mm e temperatura de
105 15 a 41°C (Agência Pernambucana de Águas e Clima - APAC, 2017).

106 Tecidos apodrecidos das hortaliças coletadas das diferentes zonas climáticas foram
107 tocados com palitos de dente esterilizados os quais foram fincados em frutos de pimentão, que
108 foram mantidos em câmara úmida por 48 h (Takatsu et al. 1981). Posteriormente, foi realizado
109 o isolamento a partir dos pimentões com sintomas de podridão mole em placas de Petri
110 contendo o meio de cultura CPG (1 g caseína hidrolisada, 10 g peptona, 10 g glicose, 18 g ágar,
111 1000 mL de água). Nesse meio, as colônias jovens (36 - 48 h) de bactérias pectinolíticas
112 visualizadas em lupa sob iluminação oblíqua apresentaram aspecto de “vidro quebrado”
113 (Kelman e Dickey 1995). Os isolados obtidos foram submetidos aos testes de Ryu e de
114 capacidade de maceração em frutos de pimentão e tubérculos de batata (Hyman et al. 2001). Os
115 isolados foram preservados em água destilada esterilizada (ADE) e por liofilização, sendo, em
116 seguida, depositados na Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de
117 Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

118 **Extração e quantificação de DNA.** A extração do DNA genômico foi realizada com
119 auxílio do kit MiniPrep (AxygenBiosciences, USA), seguindo as instruções do fabricante. A
120 quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (BioChrome WPA, Biowave DNA
121 Spectrophotometer, Harvard, USA) utilizando-se uma alíquota de 1,5 µl do DNA concentrado.
122 Após a quantificação, as amostras foram diluídas para uma concentração final de 10 ng/µL de
123 DNA e armazenadas a -20°C.

124 **Identificação molecular.** A identificação dos isolados foi realizada por meio do
125 sequenciamento da região 16S rDNA (Hauben et al. 1998) e do gene *mdh* (malato
126 desidrogenase) (Ma et al. 2007), seguindo-se o BLASTn e análise filogenética dos genes
127 isoladamente por meio de análises de Neighbor-Joining com o modelo Kimura 2 parâmetros.
128 Adicionalmente, a amplificação do DNA dos isolados foi realizada por meio dos *primers*
129 específicos Br1f/L1r para sub-espécie Duarte et al. (2004).

130 As reações foram compostas por uma mistura contendo 1X de Master Mix 2X (Promega,
131 USA) (0,05 U/µL de Taq DNA polimerase, tampão de reação, 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de

132 cada dNTP), 0,50 μ M de cada primer e 100 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em
133 termociclador modelo SimpliAmp (Massachusetts, EUA). As condições de amplificação foram
134 realizadas de acordo com Hauben et al. (1998), Ma et. al. (2007) e Duarte et al. (2004) para a
135 região 16S rDNA, gene *mdh* e para os *primers* Br1f/L1r, respectivamente. Após as
136 ampliações, 5 μ L do produto de PCR foram corados com SyBr Gold (Life Technologies,
137 Brasil), submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 1 h e visualizados em
138 fotodocumentador (Analítica, Brasil) para verificação da presença de bandas. Controles
139 negativos foram incluídos para verificar a presença de contaminantes.

140 Para os sequenciamentos, as reações foram purificadas utilizando-se 5 μ L do produto
141 de PCR acrescidos de 3,8 μ L de água ultrapura, 0,25 μ L de fosfatase alcalina, 0,5 μ L de tampão
142 fosfatase alcalina, 0,125 μ L de exonuclease e 0,5 μ L de tampão exonuclease. As amostras foram
143 postas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95° C durante 3 min;
144 30 ciclos de 94° C durante 0,5 min, 52° C durante 0,5 min e 72° C durante 1 min; e extensão
145 final a 72° C durante 6 min. Após a reação de purificação o sequenciamento foi conduzido em
146 sequenciador automatizado ABI3730 pertencente ao Laboratório de Bioinformática e Biologia
147 Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco (LABBE-UFPE).

148 **rep-PCR.** O perfil genômico dos isolados foi obtido por meio da técnica de rep-PCR
149 utilizando-se os marcadores REP (REPIR-I 5'IICGICGICATCIGGC3' e REP2I
150 5'ICGICTTATGIGGCCTAC3'), ERIC (ERIC1R 5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3' e
151 ERIC2R 5'AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG3') e BOX (5'-
152 CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3').

153 As reações foram compostas por uma mistura contendo 1X de Master Mix 2X, 0,50 μ M
154 de cada primer e 100 ng de DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador modelo
155 SimpliAmp, sendo submetidas às seguintes condições: desnaturação inicial por 7 minutos à
156 95°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94° C para desnaturação, 1 minuto a 53° C para anelamento e 8
157 minutos a 65° C para extensão; e extensão final por 15 minutos a 65° C. Após as ampliações,
158 10 μ L do produto de PCR foram corados com SyBr, submetidos à eletroforese em gel de
159 agarose a 1,5% por 3 horas e visualizados em fotodocumentador. Controles negativos foram
160 incluídos para verificar a presença de contaminantes.

161 As análises dos perfis de amplificação gerados com os marcadores REP, ERIC e BOX
162 foram realizadas visualmente de acordo com a presença (1) ou ausência de bandas (0) de 100 a
163 5000 pb, sendo registradas apenas bandas reprodutíveis (presentes em duas análises). Foram
164 utilizadas duas réplicas biológicas (amostras de DNA oriundas de duas extrações distintas para

165 confirmação da reprodutibilidade dos perfis gerados) e todas as reações foram repetidas duas
166 vezes.

167 **Análise de estrutura genética.** A diversidade e estrutura genética da população para as
168 diferentes zonas climáticas (Mata, Agreste e Sertão) foram estudadas por meio de parâmetros
169 que avaliaram a diversidade genética natural baseada em REP-PCR, a saber: diversidade
170 genotípica (G), estimada pelo índice G de Stoddart e Taylor (1988), com *bootstrap* de 1000
171 repetições; diversidade gênica (H_e), calculada pelo índice de Shannon-Weaver (Shannon e
172 Weaver 1949); fração clonal, estimada pela fórmula $(1 - (G/N))$, em que N é o tamanho da
173 amostra e G é o número de genótipos (Zhan et al. 2002); riqueza genotípica $E(g_n)$, utilizando-
174 se curvas de rarefação (Grunwald et al. 2003); equitabilidade genotípica (E_5), que avalia como
175 os genótipos estão distribuídos na amostra (Alatalo 1981; Grunwald et al. 2003; Ludwig e
176 Reynolds 1988); número de haplótipos e índice de diversidade de Simpson (Lambda) (He e Hu
177 2005).

178 Foi realizada análise discriminante de componentes principais (DAPC) (Jombart et al.
179 2010) e construída uma rede de haplótipos. Para analisar o desequilíbrio de ligação em todas
180 as subpopulações foram calculados os índices de associação (I_a) (Smith et al. 1993) e de
181 associação alternativo r_{barD} (r_a), o qual é menos sensível à variação do número de locus
182 (Agapow e Burt 2001). Para analisar a capacidade de detecção da diversidade total da população
183 e de quantos locus foram necessários para detectá-la utilizando-se o marcador REP-PCR, foi
184 construída uma curva de acumulação de genótipos. A diferenciação genética entre as
185 subpopulações foi estimada por meio do índice de F_{ST} (Wright 1931), o qual indica se há
186 diferenciação genética. Todas as análises de subpopulações foram executadas pelo programa R
187 versão 2.15.0. (R Development Core Team 2011).

188 Para estimar a percentagem de variação entre e dentro das subpopulações foi realizada
189 a análise de variância molecular (AMOVA) com o auxílio do software Arlequin versão 3.5.2.2
190 (Excoffier et al. 2005).

191 **Agressividade à couve-chinesa.** A agressividade dos isolados foi avaliada em mudas
192 de couve-chinesa (híbrido Natsume) com 44 dias. Para o preparo das suspensões bacterianas,
193 os isolados foram cultivados em meio CPG por 48 h durante $28^\circ C$, sendo as concentrações
194 ajustadas com auxílio de espectrofotômetro Analyser (São Paulo, Brasil) para $A_{570} = 0,36$ ($1 \times$
195 10^9 UFC/ml).

196 Sementes de couve-chinesa foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido
197 com 200 células contendo substrato comercial (Basaplant, Brasil). Após 20 dias, as mudas
198 foram transplantadas para copos descartáveis com capacidade de 700 mL contendo substrato e

199 solo 1:2 (v/v), sendo mantidas em casa de vegetação com irrigação diária até a montagem do
200 experimento. As plantas foram inoculadas na base do pecíolo pelo método da picada (Silva
201 2007), que consistiu na realização de um ferimento na nervura central da folha com alfinete
202 entomológico a uma profundidade de 1 mm. Em seguida, de 20 µL de suspensão bacteriana
203 foram depositados com auxílio de um micropipetador. Após as inoculações, as plantas foram
204 submetidas à câmara úmida durante 6 h em casa de vegetação.

205 Avaliações da severidade da podridão mole foram realizadas em intervalos de 6 h até
206 completar 48 h com o auxílio de uma escala descritiva que varia de 1 a 9 (Ren et al. 2001), em
207 que: 1 = sem lesão no ponto de inoculação; 2 = lesões menores que 5 mm; 3 = lesões entre 5 e
208 10 mm; 4 = lesões maiores que 10 mm, porém não atingindo a folha; 5 = lesão alcançando o
209 limbo foliar e o caule; 6 = caule infectado, porém sem atingir as folhas não inoculadas, 7 =
210 caule e folhas não inoculadas infectadas; 8 = planta inteira próxima à morte e; 9 = planta morta.
211 Após a avaliação foi determinada a severidade final da doença (SEVF), determinada às 48 h
212 após a inoculação.

213 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 27 repetições, sendo
214 cada repetição constituída por uma planta. Os pressupostos da análise de variância (ANOVA)
215 foram checados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene com auxílio do software Statistix 9
216 (Tallahassee, Flórida, Estados Unidos). Os dados foram submetidos à análise de variância
217 (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade
218 utilizando-se o software SISVAR (Ferreira 2011).

219

220 **Resultados**

221 **Identificação dos isolados.** Foram obtidos 31 isolados de alface, três de couve-chinesa,
222 um de brócolis, três de rabanete, dez de couve manteiga, dois de tomate, um de rúcula e nove
223 de abobrinha (Tabela 1). Considerando as regiões climáticas, foram obtidos 24 isolados
224 mesorregião da mata, 28 da mesorregião Agreste e 12 da mesorregião do Sertão. Todos os 64
225 isolados provenientes das três zonas climáticas produtoras de hortaliças do estado de
226 Pernambuco foram Gram-negativos e apresentaram capacidade de causar podridão mole em
227 pimentão e batata em até 48 h.

228 Os percentuais de identidade obtidos por meio das análises de BLASTn variaram de 98
229 a 99% e 99 a 100% para a região 16S rDNA e para o gene *mdh*, respectivamente, em relação
230 ao isolado tipo de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (IBSBF1692^{TS}) (Tabela 1). As árvores
231 filogenéticas construídas com as sequências da região 16S rDNA e do gene *mdh* agruparam
232 todos os isolados junto com o isolado tipo de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*

233 (IBSBF1692^{TS}) (não apresentado). Uma banda de 430 pb foi amplificada a partir do DNA de
234 todos os isolados utilizando-se os *primers* Br1f/L1r.

235 **rep-PCR.** A amplificação do DNA dos isolados com os marcadores REP, ERIC e BOX
236 revelou a presença de 22, 18 e 20 bandas reprodutíveis variando de 100 a 5000 pb. Dos três
237 marcadores analisados inicialmente, o marcador REP apresentou polimorfismos sutis nos perfis
238 dos isolados pertencentes às subpopulações de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* das
239 diferentes zonas climáticas de Pernambuco, dessa forma foi selecionado para realização das
240 demais análises, cujos resultados serão descritos a seguir.

241 **Análise de estrutura genética.** A curva de acumulação de genótipos indicou que 100%
242 dos genótipos foram detectados por meio do marcador REP-PCR, com início da formação de
243 um platô curto sendo observado com 21 *locos* (Fig. 2).

244 Foram observados 56 haplótipos distribuídos entre as mesorregiões da mata (20),
245 Agreste (26) e Sertão (11) (Tabela 2). A diversidade genotípica (G) apresentou índices elevados
246 para as três subpopulações, variando de 10,3 (Sertão) a 11,4 (Agreste). O índice de
247 equitabilidade genotípica (E_5) foi elevado para as três subpopulações, sendo observados valores
248 de 0,99 para o Agreste, 0,97 para a Zona da Mata e 0,96 para o Sertão. A diversidade gênica
249 (H_e) foi elevada para as subpopulações da mesorregião do Agreste ($H_e = 2,44$), mata ($H_e = 2,37$)
250 e Sertão ($H_e = 2,37$). A fração clonal média variou de 7 a 16%, sendo verificado que a
251 subpopulação do Agreste apresentou o menor índice e a região da Zona da Mata o maior. Índice
252 de Simpson variou de 0,90 a 0,91, sendo o maior para a mesorregião do Agreste. A maior
253 riqueza genotípica $E(g_{12})$ observada foi de 11,7 para a mesorregião do Agreste. O índice de
254 associação ($I_A = 0,74$) e o índice de associação alternativo r_{bD} ($r_{bD} = 0,034$) indicam que a
255 população de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* não se encontra em equilíbrio de ligação, não
256 havendo evidências de eventos de recombinação.

257 Apenas um haplótipo (MLG8) foi compartilhado pelas subpopulações do Agreste e
258 Sertão (Fig. 3). Os demais haplótipos (55) não foram compartilhados, indicando baixo de fluxo
259 gênico entre as subpopulações (Mata, Agreste e Sertão) do estado de Pernambuco. A análise de
260 variância molecular (AMOVA) indicou uma maior variação dentro das subpopulações
261 estudadas (93,1%) e baixa variação entre subpopulações (6,9%) (Tabela 3). A análise de DAPC
262 (Fig.4) indicou ausência de estruturação entre as subpopulações, confirmando os resultados da
263 AMOVA. Esses resultados foram confirmados pelo índice F_{ST} , que constatou ausência de
264 diferenciação genética entre as subpopulações avaliadas (Tabela 4).

265 **Agressividade em couve-chinesa.** Com base na severidade, foi possível observar a
266 formação de seis grupos de agressividade que variaram de 11,0 a 88,89 (Tabela 1). O grupo I,

267 formado pelos isolados CCRM15, CCRM95, CCRM113, CCRM122, CCRM184, CCRM634
268 e CCRM672, apresentou os maiores níveis de agressividade da doença, variando de 74,20 a
269 88,89 enquanto o grupo VI, formado pelos isolados CCRM60, CCRM77, CCRM291,
270 CCRM361, CCRM389, CCRM399, CCRM518, CCRM535, CCRM588, CCRM643 e
271 CCRM651, apresentou os menores níveis de severidade, com valores variando de 11,0 a 22,22.
272

273 **Discussão**

274 Os 64 isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* oriundos de regiões produtoras de
275 hortaliças da Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco foram obtidos de alface, couve-
276 chinesa, brócolis, rabanete, couve manteiga, tomate, rúcula e abobrinha. A primeira ocorrência
277 no Nordeste brasileiro de isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* causando podridão
278 mole em abobrinha (Moraes et al. 2017) e em couve manteiga (Queiroz et al. 2017) foi realizada
279 recentemente, indicando uma ampla gama de hospedeiros dessa bactéria. Essa característica
280 pode ser caracterizar como uma importante estratégia de sobrevivência, pois do ponto de vista
281 ecológico, a capacidade de colonizar diversas espécies de plantas em várias regiões geográficas
282 pode garantir a sobrevivência do fitopatógeno (Lin et al. 2014). Adicionalmente, os isolados
283 foram testados quanto à patogenicidade a pimentão e batata e induziram sintomas de podridão
284 mole em até 48 horas após a inoculação, indicando que a colonização ocorre de forma rápida,
285 independentemente do tecido do hospedeiro.

286 A análise dos isolados realizada por meio dos sequenciamentos da região 16S rDNA e
287 do gene *mdh* com auxílio programa BLASTn (National Center for Biotechnology Information
288 - NCBI) identificou os 64 isolados como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* com percentuais
289 de 98% a 100% de identidade de nucleotídeos em relação ao isolado tipo de *P. carotovorum*
290 subsp. *brasiliensis* (IBSBF1692^{TS}). As árvores filogenéticas construídas com as sequências da
291 região 16S rDNA e do gene *mdh* agruparam todos os isolados junto com o isolado tipo de *P.*
292 *carotovorum* subsp. *brasiliensis* (IBSBF1692^{TS}). Esses marcadores têm sido comumente
293 utilizados de forma eficiente para identificação de espécies e subespécies de *Pectobacterium*
294 (Dadasoglu e Kotan 2017; Moretti et al. 2014). Adicionalmente, todos os isolados também
295 foram identificados com os *primers* específicos Br1f/L1r, os quais amplificaram um fragmento
296 de 434 pb da região IGS de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Duarte et al. 2004).

297 A população de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* apresentou alta riqueza genotípica e
298 diversidade gênica e genotípica, indicando que a população dessa bactéria no estado de
299 Pernambuco apresentou alta variabilidade. Essa elevada variabilidade pode ser atribuída à
300 ampla gama de hospedeiros e a oferta dos mesmos durante o ano inteiro (Toth et al. 2003), uma

301 vez que populações de fitopatógenos que se mantêm altas durante o ano inteiro são mais
302 diversificadas (McDonald e Linde 2002).

303 A recombinação gênica é um evento que pode ocorrer frequentemente em populações
304 bacterianas (Smith et al. 2000) por meio de mecanismos de troca genética, como a
305 transformação, transdução e conjugação (Feil e Spratt, 2001). No entanto, foi demonstrado
306 pelos índices de associação (I_A) (0,74) e de associação alternativo rbarD (0,34) que eventos de
307 recombinação nas subpopulações de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* oriundos das diferentes
308 zonas climáticas do estado de Pernambuco foram relativamente raros, indicando que outros
309 mecanismos estão envolvidos no processo de geração de variabilidade desses isolados.
310 Resultados semelhantes foram encontrados por Melo (2016), que verificou ausência de
311 recombinação em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e Lin et al. (2014), que também
312 observam a ausência do mesmo processo biológico na população de *Ralstonia solanacearum*
313 em Taiwan.

314 Apesar de não haver indícios de recombinação e, conseqüentemente, da ocorrência de
315 baixo fluxo gênico, conforme observado pela rede de haplótipos, a variabilidade dos isolados
316 de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* em Pernambuco foi alta. Tal fato pode ser atribuído ao
317 efeito de mutações na população desta bactéria, pois em populações brasileiras de *Ralstonia*
318 *solanacearum*, uma bactéria habitante do solo assim como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*,
319 a mutação também parece ser o principal fator gerador de variabilidade genética (Santiago et
320 al. 2016). De acordo com McDonald e Linde (2002), a mutação caracteriza-se como a principal
321 fonte de variação genética em microrganismos, levando diretamente a mudanças nas sequências
322 de DNA, criando alelos na população e levando ao surgimento de isolados com maior
323 agressividade que podem quebrar a resistência de cultivares resistentes.

324 As análises de DAPC, AMOVA e diferenciação entre populações por F_{st} demonstraram
325 que não houve estruturação entre as subpopulações estudadas, apesar da provável ausência de
326 fluxo gênico. Esses resultados demonstraram que cada subpopulação apresentou características
327 genéticas próprias, mas com o compartilhamento de uma grande quantidade de *locos* que as
328 aproximaram, não permitindo a ocorrência de estruturação entre as mesmas. Resultados
329 semelhantes foram observados por Dana et al. (2015), os quais estudaram a estrutura genética
330 dos isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* de diferentes regiões do Iran por meio de
331 REP-PCR e verificaram que os isolados apresentaram diversos *locos* em comum com todos os
332 indivíduos da população, indicando que os indivíduos estavam intimamente relacionados,
333 independente da origem geográfica.

334 A severidade dos isolados induzida por *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* variou de
335 11,0 a 88,89 indicando elevada variabilidade com relação a agressividade dos isolados. Não foi
336 observada relação entre os dados de agressividade e os hospedeiros de origem ou localização
337 geográfica dos isolados. Semelhantemente, Galleli et al. (2009) quando estudaram isolados de
338 *P. carotovorum* também não encontraram relação entre agressividade, região geográfica e
339 hospedeiro de origem. Em outro estudo, Faquihi et al. (2015) estudaram 53 isolados de *P.*
340 *carotovorum* subsp. *carotovorum* de diferentes regiões geográficas do Marrocos e não
341 observaram estruturação genética por localização geográfica e hospedeiro de origem. Esses
342 autores também não correlacionaram agressividade com área geográfica.

343 Nesse contexto, o uso de isolados mais agressivos é desejável, pois proporciona maior
344 rigor na seleção e melhor discernimento entre genótipos resistentes e suscetíveis (Nakatani et
345 al. 2009).

346

347 **Conclusões**

348 Conclui-se que a população de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* em Pernambuco
349 apresentou elevada variabilidade genética e não foi recombinogênica. A principal força
350 evolutiva atuante na população provavelmente é a mutação. A população não apresentou
351 estruturação genética, pois uma grande quantidade de *locos* aproximou os isolados estudados,
352 evidenciando que os indivíduos das subpopulações estavam intimamente relacionados,
353 independente da zona climática ou do hospedeiro de origem.

354

355 **Agradecimentos**

356 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela
357 concessão da bolsa de estudos de Alessandra Jackeline Guedes de Moraes.

358

359 **Referências**

360

361 Agapow, P. M., and Burt, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol. Ecol.*
362 *Notes* 1:101-102.

363 Alatalo, R. V. 1981. Problems in the measurement of evenness in Ecology. *Oikos*, Copenhagen
364 37:199-204.

365

366 Alvarado, I. C. M., Michereff, S. J., Mariano, R. L. R., Souza, E. B., Quezado-Duval, A. M.,
367 Resende, L.V., Cardoso, E., Mizubuti, E. S. G. 2011. Characterization and variability of

- 368 soft rot-causing bacteria in Chinese cabbage in northeastern Brazil. J. Plant Pathol. 93:
369 173-181.
- 370
- 371 APAC - Agência Pernambucana de Águas e Climáticas. 2017. Sistema de Geoinformação
372 Hidrometeorológico de Pernambuco. Consulta online. <http://www.apac.pe.gov.br>.
- 373
- 374 Choi, O., and Kim, J. 2013. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on
375 paprika in Korea. J Phytopathol. 161:125–127.
- 376 Dadasogu F, and Kotan, R. 2017. Identification and characterization of *Pectobacterium*
377 *carotovorum*. J Anim Plant Sci. 27:2:647-654.
- 378
- 379 Dana, H., Khodakaramian, G., and Rouhrazi, K. 2015. Characterization of *Pectobacterium*
380 *carotovorum* subsp. *carotovorum* Causing Watermelon Soft Rot Disease in Iran. J
381 Phytopathol. 163:703-710.
- 382
- 383 De Boer, S. H., Li X., Ward, L. J. 2012. *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot
384 syndrome of potato in Canada. Phytopathology 102:937–947.
- 385
- 386 Dess, M. W., Lysoe, E., Rossmann, S., Perminow, J., and Brurberg, M. B. 2017.
387 *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). Int. J Syst
388 Evol Microbiol 67: 5222-5229.
- 389
- 390 Duarte V., De Boer, S. H., Ward L. J., and De Oliveira, A. M. R. 2004. Characterization of
391 atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. J App
392 Microbiol. 96:535–545.
- 393
- 394 Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software
395 package for population genetics data analysis. Evol. Bioinform. online, 1: 47-50.
- 396
- 397 Faquih, H., Terta, M., Amdan, M., Achbani, E. H., Ennaji, M. M., and Mhand, R. A. 2015.
398 Phenotypic and genotypic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp.
399 *carotovorum* causing soft rot disease of potatoes in Morocco. Eur J Plant Pathol
400 143:801–811.
- 401

- 402 Feil, E. J. and Spratt, B. G. 2001. Recombination and the population structures of bacterial
403 pathogens. *Ann. Rev. Microbiol.* 55: 561–590.
404
- 405 Félix, K. C. S., Oliveira, W. J., Mariano, R. L. R., and Souza, E. B. 2014. Lettuce genotype
406 resistance to “soft rot” caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Sci.*
407 *Agric.* 71: 287-29.
- 408 Ferreira, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec.* 35:6: 1039-
409 1042.
410
- 411 Gallelli, A., Galli, M., De Simone, D., Zaccardelli, M., and Loreti, S. 2009. Phenotypic and
412 genetic variability of *Pectobacterium carotovorum* isolated from artichoke in the Sele
413 valley. *J. Plant Pathol.* 91, 757–761.
414
- 415 Grunwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., and Fry, W. E. 2003. Analysis of genotypic
416 diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93:6-738-746.
417
- 418 Hauben L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and
419 Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within
420 the *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol.* 21:384–397.
421
- 422 He, F., and Hu, X. S. 2005. Hubbell's fundamental biodiversity parameter and the Simpson
423 diversity index. *Ecol Lett.* 8:386-390.
424
- 425 Hyman, L.J., Toth, I.K., Pérombelon, M.C.M. 2002. Isolation and identification. p. 66-77. In:
426 Pérombelon, M.C.M.; van der Wolf, J.M., eds. *Methods for the detection and*
427 *quantification of Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium*
428 *carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. 2ed. Scottish Crop
429 Research Institute, Invergowrie, UK.
430
- 431 Jombart, T., Devillard, S., and Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal
432 components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC*
433 *Genetics* 11:94.
434

- 435 Kelman A., and Dickey R.S., 1995. Detection of *Erwinia carotovora* and *E. chrysanthemi*. In:
436 Saettler A.W., Schaad N.W., Roth, D.A. (eds). Detection of Bacteria on Seed and Other
437 Planting Material, pp. 76-91. APS Press, Saint Paul, USA.
438
- 439 Kim, H. S., Ma, B., Perna, N. T., and Charkowski, A. O. 2009. Phylogeny and virulence of
440 naturally occurring type III secretion system-deficient *Pectobacterium* strains. Appl
441 Environ. Microbiol. 75:4539–4549.
442
- 443 Lee, D. H., Kim, J. B., Lim, J. A., Han, S. W., and Heu, S. 2014. Genetic diversity of
444 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* isolated in Korea. Plant Pathol. J
445 30:117-124.
446
- 447 Lin, C. H., Tsai, K. C., Prior, P., and Wang, J. F. 2014. Phylogenetic relationships and
448 population structure of *Ralstonia solanacearum* isolated from diverse origins in
449 Taiwan. Plant Pathol. 63:6: 1395-1403
450
- 451 Louws F.J., Fullbright D.W., Stephens C.T., and De Bruijn F.J., 1994. Specific genomic
452 fingerprinting of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and
453 strains generated with repetitive sequence and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60:
454 2286-2295.
455
- 456 Ludwig, J. A., and Reynolds, J. F. 1988. Statistical ecology: a primer in methods and
457 computing (Vol. 1). New York: John Wiley and Sons 85-103
458
- 459 Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H. S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner,
460 J. D., Perna, N. T., Kelman, A., and Charkowski, A. O. 2007. Host range and molecular
461 phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*.
462 Phytopathology 97: 1150–1163.
463
- 464 Melo, E. A. 2016. Estrutura de população e caracterização filogenética de isolados de
465 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco. Doctoral thesis,
466 Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife.
467

- 468 Mello, M. R. F., Silveira, E. B., Viana, I. O., Guerra, M. L., Mariano, R. L. R. 2011. Uso de
469 antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. Hort. Bras.
470 29:78-83
471
- 472 McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding
473 strategies for durable resistance. Euphytica 124: 163–180.
474
475
- 476 Milgroom, M. G. 2015 Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology and
477 Evolution. American Phytopathological Society Press, St. Paul, 399 p.
478
479
- 480 Moraes, A. J. G.; Souza, E. B.; Mariano, R. L. R.; Silva, A. M. F.; Lima, N. B.; Peixoto, A.R.;
481 Gama. M. A. S. 2017. First report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium*
482 *carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing soft rot of *Cucurbita pepo* in Brazil. Plant dis.
483 101:379.
484
- 485 Moraes, A. J. G., Mariano, R. L. R., Souza, E. B., Silva, A. M. F., Peixoto, A. R. Balbino, V.
486 Q., Lacerda, H., and Gama, M. A. S. 2018. Diversidade de bactérias pectinolíticas
487 causadoras de podridão mole em hortaliças em diferentes zonas climáticas do estado de
488 Pernambuco, Brasil. Plan dis. xx: xx-xx.
489
490
- 491 Nakatani AK, Lopes R, Camargo LEA (2009) Variabilidade genética de *Xanthomonas* 448
492 *axonopodis* pv. *passiflorae*. Summa Phytopathologica 35:116-120.
493
- 494 Pitman, A. R., Wright, P. J., Galbraith, M. D., and Harrow, A. S. 2008. Biochemical and genetic
495 diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New
496 Zealand. Australa. Plant Pathol. 37:559–568.
497
- 498 Queiroz, M. F., Albuquerque, G. M. R., Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Moraes, A. J. G.,
499 Souza, E. B., da Paz, C. D., Peixoto, A. R. First report of soft rot in kale caused by
500 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in Brazil. Plant dis. 101:2144.
501

- 502 Rafiei, S., Khodakaramian, G., and Ravari, B. 2015. Characterization of *Pectobacterium*
503 species isolated from vegetable crops in north-west of Iran. *Afr. J. Agric. Res.*
504 10:46:452-4267
505
- 506 Ren, J., Petzoldt, R., and Dickson, M. H. 2001. Screening and identification of resistance to
507 bacterial soft rot in *Brassica rapa*. *Euphytica* 118: 271-280.
508
- 509 Santiago, T. R., Lopes, C. A., Caetano-Anollés, G., and Mizubuti, E. S. G. 2016. Phylotype and
510 sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity
511 of the pathogen. *Plant Pathology* 66:3: 383-392.
512
- 513 Silva, A. M. F., Mariano, R. L. R., Michereff, S. J., Silveira, E. B., and Medeiros, F. H. V. 2007.
514 Survey of the intensity of soft rot on lettuce and Chinese cabbage in Pernambuco.
515 *Caatinga* 20: 84- 93.
516
- 517 Shannon, C. E., and Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. University
518 of Illinois Press, Urbana, IL.
519
- 520 Shaner, G., and Finney, R. E. 1977. The effect of ogen fertilization on the expression of slow-
521 mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056.
522
- 523 Smith, M. J., Smith, N. H., O’rourke, M., and Spratt, B. G. 1993. How clonal are bacteria?
524 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the, USA* 90:4384-4388.
525
- 526 Smith, J. M., Feil, E. J., and Smith, N. H. 2000. Population structure and evolutionary dynamics
527 of pathogenic bacteria. *BioEssays* 22: 1115–1122.
528
- 529 Stoddart, J. A., and Taylor, J. F. 1988. Genotype diversity: Estimation and prediction in
530 samples. *Genetics* 118: 705-711.
531
- 532 Tassa, S. O. M., and Duarte, V. 2006. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp.
533 *brasilensis* através de PCR-RFLP do gene *recA*. *Fitopatol. Bras.* 31:1: 23-28.
534

- 535 Takatsu, A., Mello, S.C.M., and Garcia, E.S.O.B. 1981. Fruto de pimentão como meio
536 parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. Fitopatol. Bras.6:550-
537 551.
- 538
- 539 Telles, M. P. C., Valva, F. D., Bandeira, L. F., and Coelho, A. S. G. 2003. Caracterização
540 genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. -
541 Annonaceae) no Estado de Goiás. Rev. Bras.Bot. 26:123-129.
- 542
- 543 Toth I. K., Bertheau Y., Hyman L. J., Laplaze L., Lopez M. M., J., McNicol, F., Niepold, F.,
544 Persson, P., Salmond, G. P., Sletten, A., van Der Wolf, J. M., and Pérombelon, M. C.
545 1999. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining
546 diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. J Appl Microbiol. 87: 770–781.
- 547
- 548 Wright, S. 1931. Statistical methods in biology. J. Am. Stat. Assoc. 26: 173A: 155-163.
- 549
- 550 van der Merwe, J. J., Coutinho, T. A., Korsten, L., and van der Waals, J. E. 2010.
551 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South
552 Africa. Eur. J. Plant Pathol. 126:175–185.
- 553
- 554 Versalovic, J., Koueth, T., and Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in
555 eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res.
556 19: 6823–6831.
- 557
- 558 Zhan, J., Mundt, C. C., Hoffer, M. E., and McDonald, B. A. 2002. Local adaptation and effect
559 of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant
560 pathosystem. J. Evol. Biol. 15: 634-647.
- 561
- 562
- 563
- 564
- 565

566 **Tabela 1.** Lista de isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* provenientes de diferentes municípios produtores de hortaliças da mesorregião da mata, Agreste
567 e Sertão de Pernambuco, nível de relacionamento com o isolado IBSBF1692^{PT} e agressividade em couve-chinesa

ISOLADO	CULTURA	MUNICÍPIO	MESORREGIÃO	BLASTn 16S	BLASTn <i>mdh</i>	Br1/L1	SEV
				rDNA (%)	(%)		
CCRMPCB3	Brócolis	Camocim de São Félix	Agreste	99 ^x	100 ^x	+	55,56 ^{y,z}
CCRMPCB15	Couve-chinesa	Camocim de São Félix	Agreste	99	100	+	77,78a
CCRMPCB18	Couve-chinesa	Camocim de São Félix	Agreste	100	99	+	66,6b
CCRMPCB31	Couve-chinesa	Camocim de São Félix	Agreste	99	100	+	51,85c
CCRMPCB55	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	100	+	44,44d
CCRMPCB56	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	100	+	37,04e
CCRMPCB60	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	99	+	33,33e
CCRMPCB63	Rabanete	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	99	99	+	22,22e
CCRMPCB64	Rabanete	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	99	99	+	14,81f
CCRMPCB66	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	99	+	11,11f
CCRMPCB72	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	99	100	+	11,11f
CCRMPCB77	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	99	+	11,11f
CCRMPCB95	Rabanete	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	99	+	11,11f
CCRMPCB113	Alface	Chã Grande	Zona da Mata	100	99	+	88,89a
CCRMPCB122	Alface	Chã Grande	Zona da zona	99	99	+	77,78a
CCRMPCB128	Alface	Chã Grande	Zona da Mata	99	100	+	77,78a
CCRMPCB129	Alface	Chã Grande	Zona da Mata	99	100	+	74,08a
CCRMPCB162	Couve	Chã Grande	Zona da Mata	99	99	+	74,20a
CCRMPCB165	Couve	Chã Grande	Zona da Mata	100	99	+	66,67b
CCRMPCB168	Couve	Chã Grande	Zona da Mata	100	100	+	66,67b
CCRMPCB180	Abobrinha	Chã Grande	Zona da Mata	99	99	+	66,67b

ISOLADO	CULTURA	MUNICÍPIO	MESORREGIÃO	BLASTn 16S	BLASTn <i>mdh</i>	Br1/L1	SEV
				rDNA (%)	(%)		
CCRMPCB184	Abobrinha	Chã Grande	Zona da Mata	99	100	+	66,51b
CCRMPCB185	Abobrinha	Chã Grande	Zona da Mata	100	100	+	66,40b
CCRMPCB192	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	100	+	66,25b
CCRMPCB196	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	99	+	66,07b
CCRMPCB204	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	99	+	66,03b
CCRMPCB215	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	99	100	+	55,56c
CCRMPCB228	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	99	+	55,56c
CCRMPCB273	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	100	100	+	55,56c
CCRMPCB291	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	99	100	+	55,56c
CCRMPCB293	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	99	100	+	55,56c
CCRMPCB298	Alface	Vitória de Santo Antão	Zona da Mata	99	99	+	55,56c
CCRMPCB313	Alface	Garanhuns	Agreste	99	99	+	55,56c
CCRMPCB317	Alface	Garanhuns	Agreste	100	99	+	55,56c
CCRMPCB341	Alface	Garanhuns	Agreste	100	99	+	55,0c
CCRMPCB347	Alface	Garanhuns	Agreste	99	100	+	48,15d
CCRMPCB361	Alface	Garanhuns	Agreste	99	100	+	48,15d
CCRMPCB362	Alface	Garanhuns	Agreste	100	99	+	44,44d
CCRMPCB389	Tomate	Garanhuns	Agreste	99	99	+	44,44d
CCRMPCB399	Tomate	Bezerros	Agreste	99	100	+	44,44d
CCRMPCB454	Abobrinha	Bonito	Agreste	100	100	+	40,74d
CCRMPCB489	Abobrinha	Bonito	Agreste	99	100	+	40,74d
CCRMPCB494	Abobrinha	Bonito	Agreste	100	100	+	40,74d
CCRMPCB495	Abobrinha	Bonito	Agreste	100	99	+	40,74d
CCRMPCB496	Abobrinha	Bonito	Agreste	99	99	+	40,74d
CCRMPCB518	Alface	Bonito	Agreste	100	100	+	11,0f

ISOLADO	CULTURA	MUNICÍPIO	MESORREGIÃO	BLASTn 16S	BLASTn <i>mdh</i>	Br1/L1	SEV
				rDNA (%)	(%)		
CCRMPCB535	Alface	Bonito	Agreste	100	99	+	37,04d
CCRMPCB558	Alface	Gravatá	Agreste	100	100	+	33,33e
CCRMPCB585	Alface	Gravatá	Agreste	99	100	+	33,33e
CCRMPCB588	Alface	Gravatá	Agreste	99	100	+	33,33e
CCRMPCB596	Repolho	Gravatá	Agreste	99	99	+	33,33e
CCRMPCB598	Repolho	Gravatá	Agreste	99	99	+	33,33e
CCRMPCB623	Abobrinha	Petrolina	Sertão	100	99	+	33,33e
CCRMPCB625	Couve	Petrolina	Sertão	99	99	+	29,63e
CCRMPCB627	Couve	Petrolina	Sertão	99	99	+	29,63e
CCRMPCB628	Alface	Petrolina	Sertão	99	99	+	29,63e
CCRMPCB629	Couve	Petrolina	Sertão	99	99	+	29,63e
CCRMPCB632	Beterraba	Petrolina	Sertão	100	100	+	29,63e
CCRMPCB634	Cebola	Petrolina	Sertão	100	100	+	22,22f
CCRMPCB642	Couve	Petrolina	Sertão	99	99	+	11,29f
CCRMPCB643	Rúcula	Petrolina	Sertão	99	99	+	88,89a
CCRMPCB651	Couve	Petrolina	Sertão	100	100	+	11,0f
CCRMPCB656	Couve	Petrolina	Sertão	99	99	+	11,0f
CCRMPCB672	Couve	Petrolina	Sertão	100	100	+	11,0f

568 ^x Percentual de similaridade com o isolado tipo de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (IBSBF1692^{PT}).

569 ^y Severidade estimada por meio de escala descritiva de 1 a 9 em que: 1 = sem lesão no ponto de inoculação; 2 = lesões menores que 5 mm; 3 = lesões entre 5 e 10 mm; 4 =
570 lesões maiores que 10 mm, porém não atingindo a folha; 5 = lesão alcançando o limbo foliar e o caule; 6 = caule infectado, porém sem atingir as folhas não inoculadas infectadas;
571 8 = planta inteira próxima à morte; e 9 = planta morta (REN et al. 2001).

572 ^z Médias de 27 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

573

Tabela 2. Índices de diversidade genética entre subpopulações de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* oriundas das mesorregiões da mata, Agreste e Sertão do estado de Pernambuco, Brasil

População ^a	Zona da			Total
	Mata	Agreste	Sertão	
N	24	28	12	64
Nº de haplótipos	20	26	11	56
G	10,4 (8-12)	11,4 (9-12)	10,3 (NA)	11,6 (10,2-12)
E _s	0,97 (0,94- 1)	0,99 (0,94-1)	0,96 (NA)	0,99 (0,96-1)
H _e	2,37 (2,14 - 2,49)	2,44 (2,25- 2,49)	2,37 (NA)	2,45 (2,37- 2,49)
Fração clonal	0,16	0,07	0,08	0,125
Índice de Simpson	0,90 (0,88-0,92)	0,91 (0,89- 0,92)	0,90 (NA)	0,91 (0,90- 0,92)
E(g ₁₂)	11	11,7	11	11,7
I _A				0,74 ^b
rbarD (rd)				0,34 ^b

^a N = tamanho da amostra; ; N° haplótipos= Número de haplótipos para cada população; G= Diversidade genotípica; E_s= Índice de equitabilidade genotípica; H_e=Diversidade gênica de Shannon-Weaver (1949), intervalo de confiança entre parênteses; Fração Clonal= Índice de diversidade genotípica, calculado por (1-(número de diferentes genótipos)/(total de números de isolados)); E(gn)= Riqueza genotípica ou número esperado de genótipos pelo método de rarefação; I_A = índice de associação; rbarD (r_d) = índice de associação alternativo. ^b Significativo a 1% de probabilidade. NA=não aplicável

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) das subpopulações de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* oriundas das mesorregiões da da mata, Agreste e Sertão do estado de Pernambuco, Brasil

F.V.	G.L.	S.Q.	C.V.	Percentual da variação (%)
Entre subpopulações	2	17,73	0,25 Va	6,9
Dentro de subpopulações	61	235,55	3,86 Vb	93,1
Total	63	253,28	2,21	

Tabela 4. Diferenciação genética entre as subpopulações (F_{ST}) de *Pectobacterium. carotovorum* subsp. *brasilensis* oriundas das mesorregiões mata, Agreste e Sertão do estado de Pernambuco, Brasil

	Mata	Agreste	Sertão
Mata	0,000		
Agreste	0,051	0,000	
Sertão	0,049	0,086	0,000

** Significativo a 1% de probabilidade

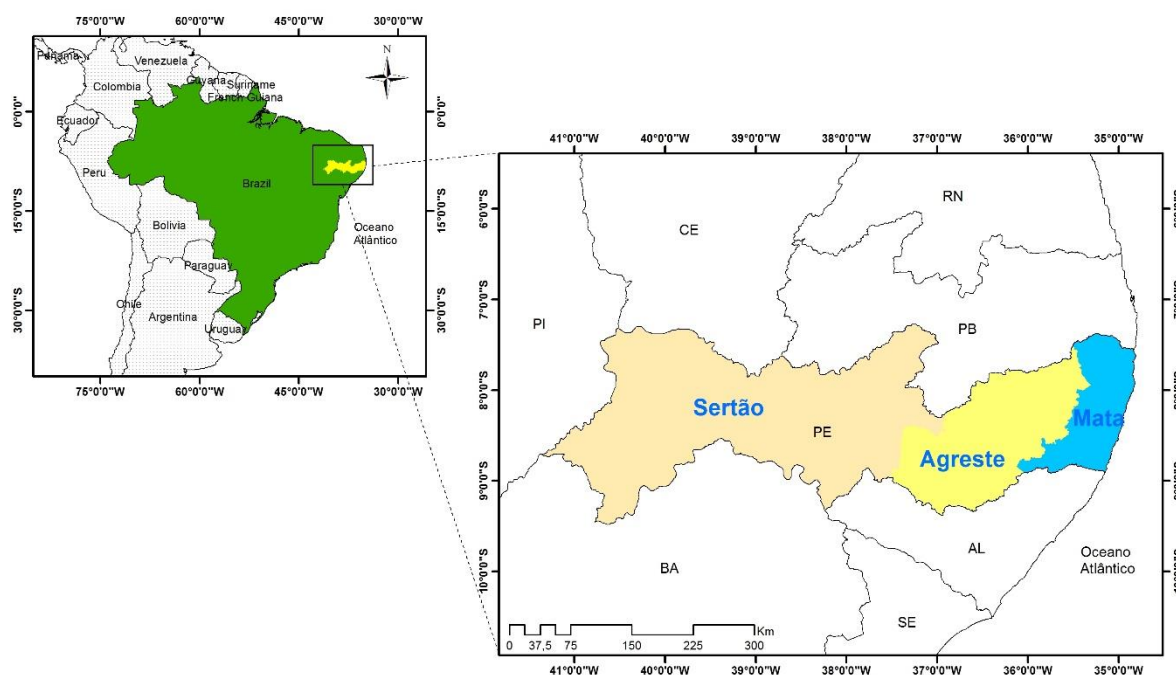


Fig. 1. Zonas climáticas (Mata, Agreste e Sertão) do estado de Pernambuco. Zona da Mata, umidade de 30 a 100%, precipitação maior ou igual a 2500 mm e temperaturas de 15 a 36°C; Agreste, umidade de 10 a 100%, precipitação de 300 a 1200 mm e temperaturas de 15 a 32°C; Sertão, umidade de 5 a 90%, precipitação de 400 a 800 mm e temperatura de 15 a 41°C (Agência Pernambucana de Águas e Clima - APAC, 2017).

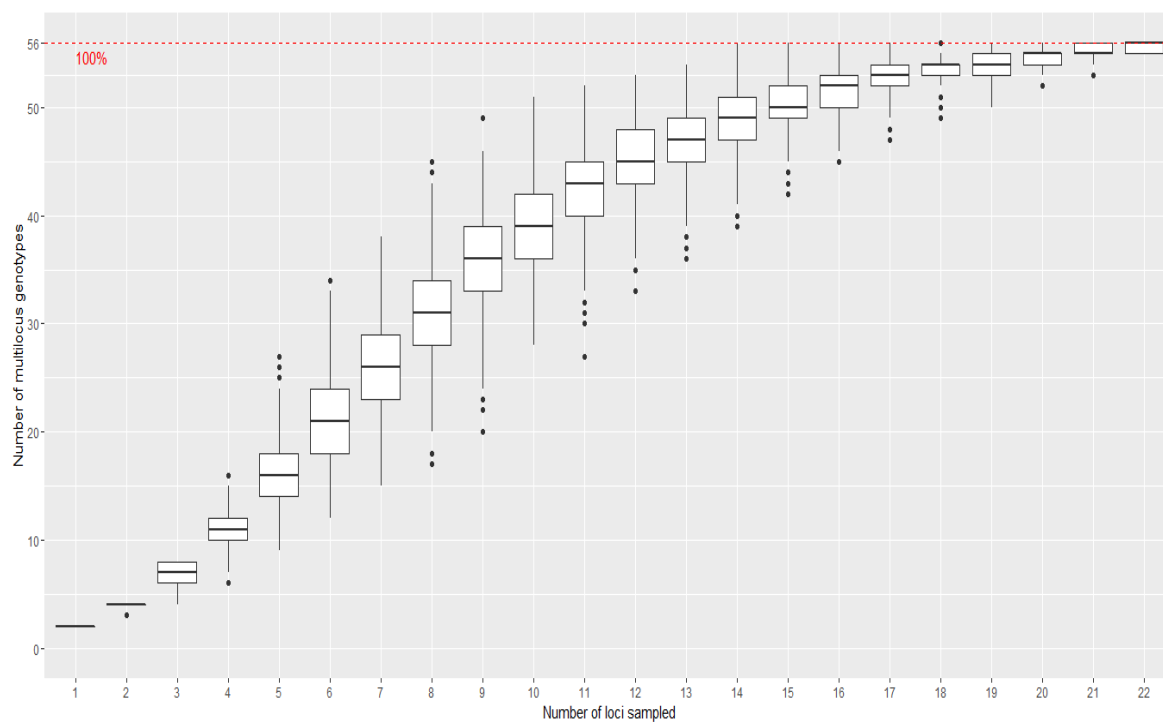


Fig. 2. Curva de acumulação de genótipos do marcador REP-PCR para 64 isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* oriundos das mesorregiões da Mata, Agreste e Sertão do estado de Pernambuco, Brasil.

POPULATION

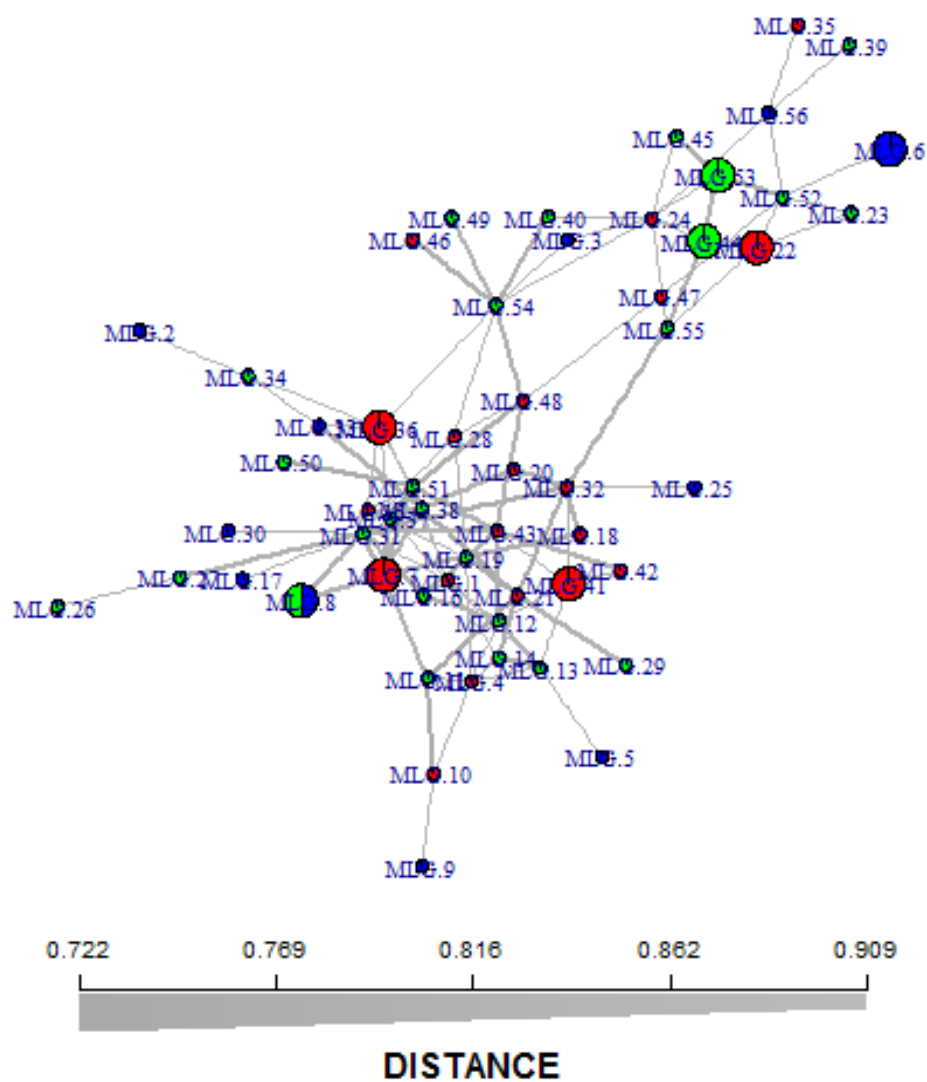


Fig. 3. Rede de haplótipos das subpopulações de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* oriundas das mesorregiões da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco, Brasil.

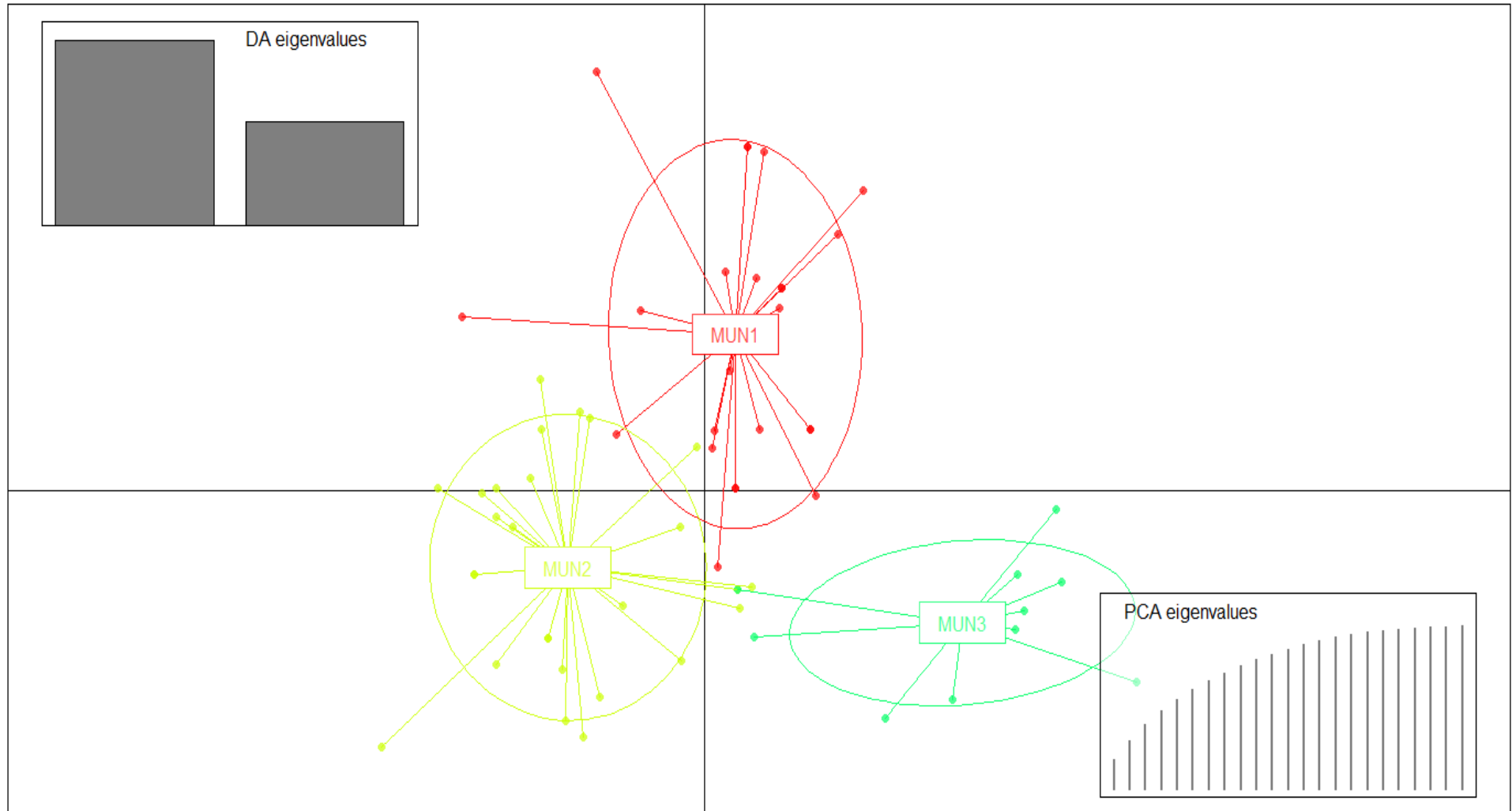


Fig. 4. Análise discriminante de componentes principais (DAPC) subpopulações de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* oriundas das mesorregiões da mata, Agreste e Sertão de Pernambuco, Brasil.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- Foi detectada elevada diversidade de gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae causando podridão mole em hortaliças nas diferentes zonas climáticas do estado de Pernambuco.
- A alface é a hortaliça mais suscetível ao ataque das enterobactérias, incluindo bactérias que são patogênicas ao homem. Os isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasileinsis* e *P. aroidearum* são as espécies prevalentes nas mesorregiões de Pernambuco.
- Foi realizado o primeiro registro da ocorrência de podridão mole causada por *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *D. dadantii* subsp. *dadantii* e *D. zae* em alface, *E. ludwigii*, *E. massiliensis* e *E. bugandensis* em abobrinha, *K. pneumoniae* subsp. *ozanae* em alface, *K. michiganensis* em alface e repolho, *M. morgani* subsp. *sibonii* em couve-chinesa, *R. inusitata* em coentro japonês, *R. terrigena* em abobora e alface, *L. amnigena* em abobrinha e *K. georgiana* em alface, berinjela e pimentão.
- A população de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* apresentou elevada variabilidade genética, não foi recombinogênica e a principal força evolutiva atuante na população provavelmente é a mutação.
- A população de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* não apresentou estruturação genética e os indivíduos das subpopulações apresentaram-se intimamente relacionados, independente da zona climática ou do hospedeiro de origem.