

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA *PECTOBACTERIUM* SPP., AGENTE CAUSADOR DA PODRIDÃO MOLE EM HORTALIÇAS

Jéssica Donelli Martin Santos e José Luiz Caldas Wolff

Apoio: PIBIC Mackpesquisa

RESUMO

A propagação de fitopatógenos que provocam doenças de complexo controle, como a podridão mole, impactam negativamente o mercado de hortaliças. Uma das principais causas dessa doença são espécies do gênero *Pectobacterium*, como a *P. carotovorum* e a *P. brasiliense*. Essas bactérias Gram negativas infectam diversos vegetais popularmente consumidos e têm impacto econômico relevante no Brasil. Dessarte, o presente estudo visou caracterizar e isolar cepas de *P. carotovorum*, para, em estudos subsequentes, avaliar o potencial de utilização de bacteriófagos no controle desse fitopatógeno. A primeira etapa do isolamento envolveu a coleta de hortaliças doentes e a inoculação em pimentões com material obtido dos tecidos lesionados. A maceração dos tecidos de pimentão, em um período de 24 a 48 horas após a inoculação, é compatível com infecção por *Pectobacterium*. Nos casos de resultado positivo, realizamos o isolamento da cepa bacteriana utilizando meio de cultura CVP-S2 modificado. As colônias que se multiplicaram nesse meio e apresentaram características típicas de *Pectobacterium* foram semeadas em meio ágar MacConkey. Posteriormente, as amostras foram submetidas à análise microscópica após a coloração pelo método de Gram. Duas cepas foram selecionadas e identificadas como CVP-1 e CVP-2. O DNA dessas cepas foi extraído, o gene 16S sintetizado pela PCR, e os dois amplicons sequenciados pelo método de interrupção de cadeia. As sequências foram analisadas usando a plataforma *Blast nucleotide*. Os resultados indicaram que ambas as bactérias isoladas pertencem ao gênero *Pectobacterium* e possuem alta similaridade com sequências do gene 16S de cepas da espécie *P. brasiliense*.

Palavras-chave: *P. brasiliense*. Cristal Violeta Pectato - CVP. Fitopatógenos

ABSTRACT

The dissemination of phytopathogens that cause diseases of complex control, such as soft rot, have a negative impact on the crop market. One of the main causes of this disease are species of *Pectobacterium* genus, such as *P. carotovorum* and *P. brasiliense*. These Gram-negative bacteria infect several popularly consumed vegetables and have a relevant economic impact in Brazil. Therefore, the present study aims to characterize and isolate *P. carotovorum* strains, in order to, in subsequent studies, evaluate the potential of using bacteriophages to control this phytopathogen. The first isolation step involved collecting diseased vegetables and inoculating peppers with material obtained from injured tissues. The maceration of sweet

pepper tissues, within 24 to 48 hours after inoculation, is compatible with *Pectobacterium* infection. In cases of positive result, we performed the isolation of the bacterial strain using modified CVP-S2 culture medium. Colonies that multiplied on this medium and showed typical *Pectobacterium* characteristics were inoculated in Petri plates with MacConkey agar. Subsequently, the samples were submitted to microscopic analysis by the Gram method. Two strains were selected and identified as CVP-1 and CVP-2. The DNA of these strains was extracted, the 16S gene was synthesized by PCR, and the two amplicons were sequenced by the chain interruption method. The sequences were analyzed using the Blast nucleotide platform. The results indicated that both bacteria isolated belong to the genus *Pectobacterium* and have high similarity with sequences of the 16S gene of strains of the species *P. brasiliense*.

Keywords: *P. brasiliense*. Crystal Violet Pectate - CVP. Phytopathogens

1. INTRODUÇÃO

Plantas são comumente atacadas por fitopatogênicos, fungos, nematoides e bactérias, que alteram suas estruturas e tecidos vegetais e que dependendo das doenças ocasionam a morte. Perdas devido aos fitopatógenos atingirem cerca de 45% do que é produzido mundialmente, causando prejuízos de centenas de bilhões de dólares (FAO, 2019).

A podridão mole é uma das principais causas de perdas de alimentos durante o plantio e a comercialização de hortaliças. O agente causador dessa doença são geralmente organismos pectinolíticos, ou seja, capazes de produzir enzimas que degradam o principal composto das plantas, a pectina. Isso leva à maceração dos tecidos vegetais, deixando manchas enegrecidas e que rapidamente levam ao apodrecimento completo. Os vegetais mais afetados incluem batata, cenoura, tomate, mandioca e pimentão (CHAHRAZADE *et al.*, 2020).

Dentre os vários microrganismos capazes de causar a podridão mole destaca-se a *P. carotovorum*, espécie bacteriana mais frequentemente encontrada em isolados de hortaliças acometidas por essa doença. O desenvolvimento da doença é afetado por diversos fatores, tais como as condições climáticas e o tipo de solo. A contaminação pela bactéria pode ocorrer desde a etapa do plantio até o manuseio pós-colheita (CZAJKOWSKI *et al.*, 2011). O controle de fitopatógenos com antibióticos é considerado altamente problemático devido ao alto custo, aos riscos ambientais e a seleção de cepas resistentes. Na verdade, o aparecimento de cepas de *P. carotovorum* altamente resistentes a antibióticos já dificulta o controle destes fitopatógeno (MARTINS *et al.*, 2018).

Tendo em vista essas circunstâncias, a busca por métodos alternativos para o controle de *Pectobacterium* spp. desperta grande interesse na comunidade científica. Os bacteriófagos, vírus que infectam procariontes, oferecem um grande potencial de serem utilizados no controle deste fitopatógeno (GARCIA *et al.*, 2008; LIM *et al.*, 2013).

De acordo com a literatura (CZAJKOWSKI *et al.*, 2011), as infecções de hortaliças ocasionadas por *P. carotovorum*, geralmente acontecem com a contaminação dos solos das lavouras onde são cultivados esses tubérculos, frutos e raízes tuberosas, assim como na água utilizada para lavar depois da colheita, disseminados por insetos e até mesmo durante chuvas, durante períodos mais quentes que estimulam a proliferação da bactéria. A forma mais comum de contágio é no manejo pós-colheita, durante o transporte, armazenagem e comercialização. Lesões que ocorrem nestas etapas podem servir como porta de entrada do patógeno facilitando a sua transmissão (SINGH; SHARMA, 2018).

Entretanto, as hortaliças podem ser contaminadas por diversos agentes etiológicos, e que por vezes os sintomas podem ser similares aos gerados pela *P. carotovorum*. Por isso,

somente a análise dos sintomas não é suficiente para se identificar a causa da podridão mole e para o implemento de medidas de controle dessa doença (CHAHRAZADE *et al.*, 2020).

Destarte, o estudo propôs avaliar algumas espécies de hortaliças amplamente consumidas visando a identificação e o isolamento de cepas de *P. carotovorum* de importância econômica e de difícil controle. As cepas de *P. carotovorum* isoladas neste estudo serão incorporadas à coleção de cepas do laboratório de Biologia Molecular da UPM e serão usadas, em estudo subsequente, para a triagem de bacteriófagos com potencial de uso no controle de *P. carotovorum*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

As plantas como todos os seres vivos da biosfera sofrem ataques e infecções de microrganismos patogênicos, como fungos e bactérias, ocasionando doenças de grande impacto econômico e social (FAO, 2019). No caso das hortaliças elas são geralmente acometidas de uma doença muito comum, denominada, podridão mole, que destrói a integridade dos tecidos vegetais devido a degradação da pectina presente nas paredes celulares (CHARKOWSKI, 2015).

Na maioria dos casos, a podridão mole tem como microrganismos causador, bactérias pectiolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. No caso das *Pectobacterium*, todas as espécies conseguem infectar uma grande variedade de hortaliças, como, batatas, cenouras, pimentas, tomates, couve-flor e, levando-as a putrefação de seus tecidos e sua inutilização para consumo (MANSFIELD *et al.*, 2012). Apesar disso, outros microrganismos como fungos e outras fitobactérias Gram negativas e Gram positivas, podem causar a podridão mole em vegetais, o que pode dificultar a identificação somente pelos sintomas da doença (DUAN *et al.*, 2013).

Contudo, o organismo que geralmente está associado a essas contaminações é a *P. carotovorum*, sendo antigamente denominada de *Erwinia carotovora* (WASANA *et al.*, 2019). A presença da fitobactéria *P. carotovorum* foi descrita em estudos, por ser a causa principal de podridão mole em uma grande diversidade de hortaliças e outras plantas cultiváveis, por todo mundo (ZACZEK-MOCZYDŁOWSKA *et al.*, 2019). A *P. carotovorum* pertence à família Enterobacteriaceae que contém muitos gêneros e espécies bacterianas de suma importância a humanidade, são microrganismos Gram negativos, não formam endósporo, capazes de sobreviver em meios que tenham ou não a presença de moléculas de oxigênio, sendo assim, anaeróbios facultativos, tem formato de bastonetes retos e se locomovem por meio de flagelos (BRENNER; FARMER, 2015).

É comum utilizar-se de meios de cultura que contenham açúcares para identificá-las, uma vez que produzem enzimas que degradam moléculas mais complexas em mais simples,

o que permite a diferenciação das espécies (MUTURI *et al.*, 2019). Cepas de *P. carotovorum* podem ser identificadas utilizando-se o meio cristal violeta pectato (CVP), que permite o crescimento apenas de organismos pectinolíticos gerando colônias com aparência de “vidro quebrado” (DOS SANTOS *et al.*, 2020; HYMAN; TOTH; PÉROMBELON, 2002). Contudo esse aspecto pode ser inibido por microrganismos saprotróficos (TUMELERO, 2003).

Outra estratégia para se determinar esse gênero de fitobactérias é por reações bioquímicas, a mais utilizada é de catalase, com resultado positivo (HYMAN; TOTH; PÉROMBELON, 2002) e ensaios biomoleculares capazes identificar marcadores filogenéticos importantes em determinados genes (PATEL *et al.*, 2017; ALINEJAD *et al.*, 2020). O sequenciamento da região 16S do rRNA são frequentemente utilizados para tal finalidade, através do método de sequenciamento por interrupção de cadeia (TUMELERO, 2003; WALKER; LORSCH, 2013).

A principal distinção e característica das bactérias do gênero *Pectobacterium* é que elas são capazes de degradar a parede celular das plantas que infectam, isso é possível devido uma síntese de pectinases, enzimas capazes de degradar a pectina. As enzimas mais comuns em *P. carotovorum* são as pectato lisases e pectina liases (MAISURIA; NERURKAR, 2012). A pectina é um composto polissacarídeo macromolecular da parede celular, conferindo rigidez e protegendo contra a lise celular e a desidratação (RALET; LEROUGE; QUÉMÉNER, 2009). Ademais, esse complexo composto polissacarídeo é o principal constituinte da lamela média da parede celular, sendo o local hidrolisado pelas pectinases que foram extracelularmente liberadas pelos procariontes pectinolíticos (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Segundo Verzignassi (2007), esse processo enzimático de bactérias fitopatogênicas é originado no momento que entram em contato com algum ferimento na superfície da planta, posteriormente, transpassando para o interior do tecido vegetal com a liberação extracelular das enzimas. Os primeiros sinais da infecção são lesões com aparência flácida e depois com o tempo aumentam e desenvolvem manchas amarronzadas e pretas. No estágio mais avançado ocorre a necrose, caracterizada pela grave maceração dos tecidos levando-os a ter um forte odor, culminando na morte do vegetal doente (CARVALHO FILHO; DE MELLO, 2008).

Os sintomas da podridão mole podem variar dependendo da espécie vegetal. As mais afetadas por essa doença são hortaliças, tubérculos e frutos largamente produzidos para o consumo humano, principalmente mandioca, cebola, batata, cenoura, couve-flor, pimentão e o tomate (OPARA; ASUQUO, 2016). Conforme o estudo de Portier *et al.* (2019), o tomate e a batata são igualmente afetados pela ação da *P. carotovorum*, com ênfase para as

subespécies, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*.

Os sintomas da podridão no tomateiro, *Solanum lycopersicum* (sin. de *Lycopersicon esculentum* Mill), são muito semelhantes aos descritos anteriormente em outras hortaliças, com uma ferida exposta o fitopatógeno infecta o caule e o fruto. Depois de algumas horas os sintomas se iniciam levando ao desenvolvimento de manchas encharcadas e partes amarronzadas, e, finalmente, a necrose total dos tecidos (JARAMILLO; HUERTAS; GÓMEZ, 2017). Assim como no fruto, os tubérculos da espécie *Solanum* sp. apresentam manchas enegrecidas e rápida deterioração do órgão vegetal, provocando a morte da planta (EL TASSA; DUARTE, 2004).

De acordo com Opara e Asuquo (2016), os primeiros sinais da podridão na raiz tuberosa *Daucus carota* L (cenoura) começam com regiões encharcadas, que possuem uma sensação pastosa ao toque, levemente esverdeadas, que podem enegrecer com o tempo. A podridão mole também é extremamente comum em cebolas (*Allium cepa* L), os sintomas, no entanto não são tão aparentes, geralmente a parte externa pode ficar mais enegrecida, entretanto a maceração em tons amarronzados e com um cheiro pútrido pode ser facilmente verificada com um corte longitudinal, possibilitando uma visão do interior dos catáfilos (MARCONATTO; KOEHLER; MARCUZZO, 2017).

Não existem métodos de controle muito eficientes para combater a infecção de *P. carotovorum* depois do contágio, porém, manter a alta qualidade do plantio, da colheita e principalmente da cadeia de abastecimento é extremamente necessário (CHARKOWSKI, 2015). A fim de mitigar a carência de tratamentos, fez-se o uso excessivo e a longo prazo de antibióticos, resultando na seleção de cepas bacterianas com genes de resistência. A proliferação dessas cepas praticamente impede o uso desses compostos nas lavouras (MARTINS *et al.*, 2018).

Existem pesquisas voltadas para encontrar substitutos para os antibióticos, utilizando-se do método de biocontrole da *P. carotovorum* com outros microrganismos (ALINEJAD *et al.*, 2020). Apesar desses estudos apresentarem bons resultados, o controle microbiológico que se sobressai, são os bacteriófagos, por terem a capacidade de infectar células procariontes, de coevoluir com seus hospedeiros, e de serem inofensivos a células eucariotas e ao meio ambiente (LIM *et al.*, 2013). Um exemplo da alta eficácia de bacteriófagos é a recente pesquisa feita por Muturi *et al.* (2019), que utilizando um composto a base de fagos conseguiu conter em 100% a proliferação das bactérias que estavam ocasionando a podridão mole em batatas. Conforme Kering, Kibii e Wei (2019) serão necessárias mais pesquisas visando confirmar a eficácia dos bacteriófagos no controle microbiológico de fitobactérias, uma vez que ainda

existem poucas informações na literatura. Isso também pode ser aplicado no caso do controle da espécie de bactéria *P. carotovorum*.

3. METODOLOGIA

3.1 Caracterização e coleta de amostras

Conforme a proposta do presente projeto em isolar e caracterizar cepas bacterianas pertencentes a espécie *P. carotovorum*. Coletou-se hortaliças de variados gêneros (raízes tuberosas, frutos e tubérculos) que apresentavam os sintomas da doença podridão mole. As amostras foram escolhidas, em comércios (feiras livres, mercados e sacolões etc.) na cidade de São Paulo – SP. Os sintomas incluem, áreas com um aspecto de encharcamento, assim como uma coloração que pode variar de marrom para preto, e apresentar um odor muito forte e fétido (OPARA; ASUQUO, 2016). O material foi armazenado em sacos plásticos, previamente esterilizados em álcool etílico 70% com o auxílio de luvas cirúrgicas, depositados em compartimentos com gelo para preservar a amostra e em seguida esses conteúdos foram encaminhados para o laboratório, para as posteriores análises experimentais de identificação para determinar a causa da podridão mole (EL TASSA; DUARTE, 2004).

3.2 Composição e preparo dos meios de cultura

Efetuuou-se o preparo do meio de cultura Cristal Violeta Pectato – CVP-S2 modificado em duas alíquotas cada uma com um volume de 50 mL em frascos tipo Erlenmeyer com base no protocolo desenvolvido por Hyman, Toth e Pérombelon (2002). A composição da mistura com: triptona 100 mg; citrato de sódio 500 mg; NaNO₃ 200 mg; solução de CaCl₂ di-hidratado 1,02 mL (10%); solução de cristal violeta 0,2 mL (0.1%); ágar 0,8 g (0,8%) e água destilada até completar o volume. O mix B contendo: pectina cítrica 1,8 g; NaOH 20% (5 mol L⁻¹) 0,25 mL e água destilada até atingir 50 mL. Preparou-se as soluções separadamente, desse modo, para a mistura A os reagentes sólidos foram pesados e dissolvidos em água destilada com um agitador magnético ou bastão de vidro. Quanto a mistura B, na capela de exaustão, foi adicionado primeiro o NaOH 20%, em seguida a água destilada, após isso, dissolveu-se a pectina aos poucos em agitador magnético na velocidade máxima, para que não ocorresse a formação de grânulos.

Feito isso, verificou-se e ajustou-se o pH da mistura B, com o auxílio de um pHmetro, tendo em vista que, depois da autoclave o meio tende a ter uma acidificação acentuada. Utilizando-se da solução NaOH 20% até que o pH marque entre >11,90 e <12,10 (SKIRVIN *et al.*, 1986). Em seguida, as soluções foram autoclavadas por 15 min a 120°C. Assim que finalizado, em fluxo laminar inseriu-se 1.315 µL do antifúngico Difenconazole (0,075 mg/g) na solução A, para inibir o crescimento de fungos (FILIMON *et al.*, 2018). Depois, com as duas soluções ainda quentes, os conteúdos de A e B foram misturados e imediatamente

transferidos para placas de Petri estéreis, com um volume de aproximadamente 20 mL para cada, que permaneceram parcialmente abertas até a solidificação do ágar. Esta última etapa realizada dentro do fluxo laminar.

O meio *Luria Broth* (LB) e o *Luria Agar Broth* (LA), seguiram os padrões de preparo especificados por MacWilliams e Min (2006), desse modo tem-se que para cada alíquota de 100 mL preparado 1 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura e 1 g de NaCl, e no meio LA deve-se adicionar 1,5 g (1,5%). O ágar MacConkey também foi preparado em alíquotas de 100 mL. No entanto, usou-se 5,15 gramas de ágar MacConkey comercial pré-preparado. A composição do meio MacConkey é a seguinte: peptona, proteose peptona, lactose, NaCl, cristal violeta, vermelho neutro, sais biliares e ágar bacteriológico (ALLEN, 2005). Seguindo o mesmo procedimento descrito acima para o meio CVP, para todos os meios de cultura, com exceção do ajuste em PHmetro.

3.3 Inoculação e multiplicação em pimentão verde (*Capsicum annuum* L.)

O primeiro passo para o isolamento de *P. carotovorum* partiu da inoculação em pimentão verde, que serve de meio parcialmente seletivo para o crescimento de bactérias pectinolíticas. As inoculações em pimentão seguiram os protocolos previamente descritos por El Tassa e Duarte (2004). Com esse propósito os pimentões verdes saudáveis foram escolhidos e higienizados com água destilada esterilizada (ADE), em hipoclorito de sódio (1%) por 30 segundos e em álcool 70% por 30 segundos. Depois de realizado esse processo os pimentões puderam ser colocados em uma bancada coberta com papel toalha até que estivessem completamente secos. Em fluxo laminar o pimentão foi seccionado em tiras com um bisturi estéril. Terminado esse processo com palitos de madeira esterilizados foram introduzidos nas áreas afetadas da hortaliça e posteriormente inseridos nos pimentões. Ao fim da inoculação, esses pimentões foram dispostos em recipientes adequados e esterilizados, incubados por aproximadamente 48h à 28°C.

3.4 Inoculação e multiplicação em meio de cultura

Discorrido o tempo da incubação, pimentões que apresentaram sinais típicos de infecção serviram como fonte de inóculo para o cultivo em meio de cultura cristal violeta pectato (CVP), que permite a identificação de colônias formadas por bactérias pectinolíticas.

Uma alça bacteriológica esterilizada foi utilizada para transferir o inóculo microbiano que se multiplicou no tecido do pimentão para uma placa de Petri com meio CVP – S2 modificado. A semeadura foi feita pela técnica de esgotamento e, em seguida, as placas puderam ser transferidas para estufa bacteriológica onde foram incubados por aproximadamente 48h a 30°C. Ao final desse período, a formação de colônias com o aspecto arredondado levemente esbranquiçados indicou que ocorrerá a degradação de pectina

cítrica, ou seja, confirma que o microrganismo tem ação pectinolítica (GOKUL *et al.*, 2019). As colônias com esta aparência foram semeadas em ágar MacConkey (meio seletivo) por 24h à 30°C para crescimento de cultura, com o intuito de selecionar bactérias Gram negativas (WASANA *et al.*, 2019).

3.5 Caracterização por coloração de Gram

A realização da coloração de Gram deu-se para determinar a seleção de bactérias Gram negativas e a observação microscópica também permitiu a observação do formato das bactérias.

A técnica padrão da coloração de Gram sucedeu-se utilizando colônias que cresceram em meio MacConkey produzindo coloração vermelha (lactose positiva) (MOYES; REYNOLDS; BREAKWELL, 2009). Esfregaços foram realizados com uma pequena quantia de material obtido das colônias. Então a lâmina foi seca com o ar do ambiente, e logo foi fixada com calor. Quando terminada essas etapas o conteúdo foi corado com cristal violeta por 1 minuto, logo em seguida adicionou-se algumas gotas de uma solução iodada e aguardou-se 1 minuto. Então foi acrescentado etanol absoluto por alguns segundos e em seguida aplicou-se o segundo corante, a fucsina, que depois de alguns minutos a lâmina pode ser observada em microscópio óptico. Colônias com bastonetes Gram negativos foram transferidos para uma nova placa com meio CVP. Após o crescimento essas cepas foram utilizadas nos ensaios bioquímicos.

3.6 Caracterização bioquímica por teste de catalase

Para determinar a reação de catalase, adicionou-se em uma lâmina, uma pequena quantidade das colônias semeadas previamente em ágar, por fim foi aplicado uma gota de solução aquosa de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. Caso ocorra em seguida a formação de bolhas, a reação foi positiva para *Pectobacterium* (HYMAN; TOTH; PÉROMBELON, 2002).

3.7 Condições de crescimento e armazenamento das culturas puras

Quando constatado que os isolados possuem particularidades inerentes de *P. carotovorum*, essas bactérias foram semeadas exclusivamente para o armazenamento de culturas puras. Desse modo, placas de Petri, previamente preparadas com o meio LA (*Luria Agar Broth*), serviram para multiplicação dos isolados pelo método de esgotamento. Estas placas incubadas em uma estufa bacteriológica por um período de 24h à 30°C.

Assim que finalizado a incubação em meio LA, uma colônia foi removida com uma agulha bacteriológica de forma asséptica, deste modo a alça com as bactérias foi emergida em tubos de ensaio preparados com caldo LB. Os tubos de ensaio foram colocados cuidadosamente em uma estufa bacteriológica, as mesmas condições que o crescimento em

meio de cultura LA. A fim de incubar as amostras até o aparecimento de turbidez (o que indica fase exponencial de crescimento). Após o crescimento das culturas puras isoladas da fitobactéria, adicionou-se glicerol esterilizado para atingir uma concentração final de 15%. Os isolados então foram transferidos para tubos criogênicos (criotubos) e armazenados em freezer a uma temperatura de - 80°C.

3.8 Extração de DNA com Brazol

Para a extração do material genético das culturas, foi realizado o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente Brazol, LGC Biotecnologia (AUSUBEL et al. 1992; CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987; CHOMCZYNSKI, 1993; CHOMCZYNSKI; MACKEY, 1995, 1996). Portanto, as colônias em tubo com o meio LB (*Luria Bertani*) 5 mL foram transferidas para tubo Falcon, ressuspensas em 500 µL de Brazol, agitados no vórtex, depois adicionou-se 125 µL de clorofórmio gelado. Feito isso, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM (12.000 x g) por 20 minutos.

Ao fim da centrifugação o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 250 µL de etanol absoluto gelado, que foram então agitados por inversão por 2 minutos e centrifugados a 10. RPM por 15 minutos. Finalizado essa etapa o sobrenadante foi desprezado por aspiração cuidadosa, o pellet foi lavado com 250 µL de etanol 70%, e homogeneizado por inversão e por fim centrifugado a 10.000 RPM durante 10 minutos. O desprezou-se o sobrenadante e a amostra foi deixada secando a temperatura ambiente, depois o pellet pode ser dissolvido em 100 µL água estéril. Analisou-se pela técnica da concentração em géis de agarose.

3.9 Eletroforese em gel

A realização da eletroforese em gel foi feita preparando uma solução de TBE 0.5x com 0,8% de agarose (0.24 g), após pesar e quantificar os reagentes em um frasco Erlenmeyer (abertura coberta com plástico filme e perfurada) a mistura foi dissolvida. Quando a solução estava morna a cuba com o pente pode ser preparada. Assim que o gel solidificou o pente pode ser retirado, em seguida, posicionou-se a cuba na caixa de gel e o mesmo tampão utilizado no preparo foi utilizado na caixa. Os poços puderam ser carregados e os eletrodos inseridos na fonte de energia e o equipamento ligado na voltagem de 70 a 90 volts. Quanto às quantidades de reagentes utilizados têm-se que para o DNA padrão λ /Hind III, diluindo 1 µL em 8 mL de H₂O ultrapura além de adicionar 1 µL do corante BlueGreen, para a amostras de DNA são utilizados 9 µL desta e apenas 1 µL de BlueGreen. Os negativos foram os poços vazios.

3.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação do gene 16S das colônias isoladas foi realizada através do método de

Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. As proporções utilizadas foram: 1 µL; PCR Buffer 5 µL; dNTP (2,5 mm) 5 µL; enzima Taq polímerase 1,5 µL; Primers 2 µL, sendo 1 µL para cada um dos primers universais forward e reverse na concentração de 10 picomols/ µL, e 39 µL de água ultrapura completando o volume de 50 µL. Os demais parâmetros para a reação estão descritos na tabela abaixo (PATEL *et al.*, 2017; ALINEJAD *et al.*, 2020).

Tabela 1. Parâmetros para a reação PCR do gene 16S rRNA.

Gene	Primers	Sequência 5' - 3'	Ciclo Termociclador
16S rRNA	Forward 63 (posição 63–83)	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	1(94°C – 3') / 2 (94°C – 1') / 3 (55°C – 1') / 4 (72°C – 1'50") / 5 – 32x (94°C – 1') / 6 (72°C – 5') / 7 (15°C for ever) / Final (4°C)
16S rRNA	Reverse 1387 (1387–1404)	GGG CGG WGT GTA CAA GGC	

3.11 Purificação dos amplicons

A purificação das amplificações seguiu os procedimentos determinados pelo E.Z.N.A Cycle-Pure Kit (200). Por conseguinte, adicionou-se 2x o volume da amostra, o tampão XP1, feito isso o material foi homogeneizado e transferido para o microtubos específicos que contém a fita de sílica (capaz de reter o DNA), aguardando 1 minutos para centrifugar as amostras a 10.000 RPM por 1 minuto. Descartado o filtrado, efetuou-se uma lavagem do material com 700 µL do tampão SPW, centrifugando o produto a 10.000 RPM (1 minuto). O processo foi realizado mais uma vez e, depois, puderam ser transferidos para microtubos de 1,5 mL e centrifugados. Por fim, diluiu-se os amplicons em 50 µL de água ultrapura morna (1 minuto) e levados para a centrifugação a 10.000 RPM (1 minuto). A quantificação da concentração final dos ácidos nucleicos obtidos nas amostras dos amplicons foi mensurada através de leitura em espectrofotômetro e em gel de agarose.

3.12 Sequenciamento gene 16S rRNA pelo método de Sanger

O sequenciamento do gene de interesse 16S rRNA para a caracterização e determinação dos amplicons purificados (PATEL *et al.*, 2017), procedeu-se pelo método de interrupção de sequência de Sanger conforme as especificações do fabricante do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem. Possibilitando assim a análise filogenética do DNA das colônias isoladas, concluindo assim a caracterização da *P. carotovorum* ou de outras espécies fitopatogênicas (TUMELERO, 2003; WALKER; LORSCH, 2013). Efetuou-se a reação de sequenciamento pelo método de Sanger dos amplicons purificados, conforme os dados contidos na tabela 2.

Ao fim dessa etapa, os 40 µL do produto da reação foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, em seguida adicionou-se 80 µL de isopropanol 75% (gelado), que depois foi agitado em vórtex e refrigerado por 15 minutos. Então o material protegido da luz foi centrifugado por 35 minutos a aproximadamente 14.500 RPM, assim que completado, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 µL de etanol 70% gelado, a amostra foi agitada novamente e centrifugada em seguida por 10 minutos (~14.000 RPM), descartando o sobrenadante. Ao fim

do procedimento o pellet foi mantido 96 °C por 2 minutos em banho seco, o produto foi congelado até que sejam sequenciados em eletroforese capilar em gel, os dados obtidos são então analisados.

Tabela 2. Parâmetros para sequenciamento por interrupção de cadeia

Amostra	Amplicons	Primer (10 picomols/UL)	Reagentes	Ciclo Termociclador
1	A1	63 F	2,5 µL do DNA molde; 16 µL de BigDye; 10 µL de H ₂ O ultrapura; 1,5 µL do primer	1(96°C – 1')/ 2(96°C – 15")/ 3 (50°C – 15")/ 4 (60°C –
	A2	1387 R		4')/ 5 – 35 X (96°C – 15")/ 6
2	A3	63 F		(16 °C for ever)/ Final 4 °C
	A4	1387R		

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização bioquímica e morfológica das amostras

Foram coletadas 26 amostras de hortaliças doentes (tabela 3), que apresentavam os sintomas típicos de podridão mole, possuindo porções do tecido vegetal com aparente putrefação e maceração, de coloração marrom e áreas encharcadas. Descartou-se da coleta de amostras, qualquer outro vegetal que apresentasse indícios sintomatológicos distintos (CARVALHO FILHO; DE MELLLO, 2008), alguns casos dessa exclusão foi infecção pelos ditos bolores (DUAN *et al.*, 2013).

Dos potenciais hospedeiros da *P. carotovorum*, obteve-se os mais variados tipos vegetais incluindo pepino, batata, pimentão maduro (vermelho), cebola, cenoura e tomate, sendo esses, em geral acometidos por fitobactérias, incluindo a de interesse de isolamento (MANSFIELD *et al.*, 2012). Em meio a esses vegetais coletados e testados com presumível podridão mole, obteve-se um número expressivo de tomates, alcançando mais de 57% das amostras (Tabela 3). A Justificativa mais plausível para essa quantidade deve-se a fragilidade dos tecidos da espécie *Solanum lycopersicum* (sin. de *Lycopersicon esculentum* Mill) à cortes e lesões que resultam em uma maior suscetibilidade à contaminação por pectobactérias (SINGH; SHARMA, 2018; VERZIGNASSI, 2007).

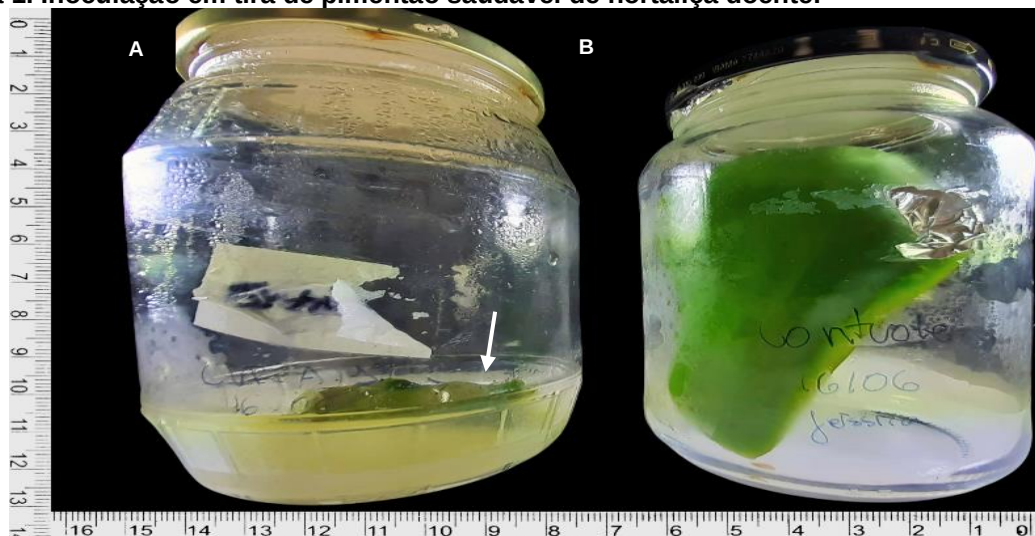
Quanto à inoculação das amostras em pimentões verdes saudáveis, o procedimento decorreu em 15 amostras positivas para a manifestação de sintomas semelhantes a podridão mole causada por *Pectobacterium* (Tabela 3). Podendo ser verificado uma rápida deterioração dos tecidos vegetais e consequentemente a maceração gradual. Em amostras mais distintas a formação de um caldo (figura 1) provocado pela ação excessiva das enzimas pectina liases, impelindo uma modificação acentuada do aspecto do pimentão (JARAMILLO; HUERTAS; GÓMEZ, 2017). Constatou-se ainda um forte odor advindo dessas amostras. O pimentão verde nessa etapa é um procedimento necessário, devido à alta contaminação e rápido apodrecimento que esses membros da família *Solanaceae*, juntamente com o tomate, são os mais afetados por pectobactérias (OULGHAZI *et al.*, 2021).

Tendo em vista as características inerentes da *P. carotovorum*, o critério utilizado para

escolher as amostras partiram-se por eliminação, ou seja, aquelas que apresentavam resultados negativos em um dos procedimentos eram descartadas. Desse modo, foi escolhida apenas culturas bacterianas com a capacidade de lisar pectina *in natura* (hortaliças) ou no meio CVP – S2, Gram negativa, lactase positiva e com formato de bastonetes (BRENNER; FARMER, 2015; MUTURI *et al.*, 2019), em conformidade com a tabela 3. Perfazendo-se na identificação de uma amostra de tomate com sintomatologia semelhante a podridão mole, identificado pelo n° 17 (Tabela 3), que apresentou resultados positivos para todos os ensaios químicos e estruturais. Em vista disso, esse material foi isolado e armazenado.

No entanto, durante o processo de seleção das culturas pela inoculação no meio de cultura CVP – S2 não ocorreu a formação característica de “vidro quebrado” em diversas amostras, algo que fora indicado na literatura (TUMELERO, 2003). Esse tipo de resultado é justificável, tendo em vista que o antifúngico utilizado em algumas amostras não apresentou alta eficácia, levando ao crescimento de outros microrganismos que podem inibir essa aparência (CHAHRAZADE *et al.*, 2020). As colônias bacterianas utilizadas no isolamento, apresentaram uma conformação descrita por Gokul *et al.* (2019) como: arredondadas pequenas e com uma coloração levemente esbranquiçada, e aparência “gelatinosa”. Desse modo, a necessidade de inserção de antifúngico (FILIMON *et al.*, 2018) nos meios de cultura fez-se necessário para melhorar a assertividade e chances de isolar a fitobactérias, especificamente do gênero *Pectobacterium*.

Figura 1. Inoculação em tira de pimentão saudável de hortaliça doente.



*Um pimentão verde saudável médio foi seccionado em duas tiras: a tira A, foi inoculada a partir da perfuração com palitos de madeira (estéreis) que foram emergidos em meio LB, contendo uma cultura pura isolada de fitobactérias provenientes da amostra n° 17 (Tabela 3). Quanto ao frasco B esse corresponde ao pimentão controle, onde foi feito apenas perfurações com o palito de madeira estéril, sem células bacterianas. As amostras foram incubadas em por apenas 24h à 30°C em estufa. Resultando na total maceração dos tecidos vegetais da tira de pimentão do frasco A, enquanto a tira B (controle), conservou suas características estruturais e não apresentou sinais da podridão mole.

Uma outra dificuldade encontrada no processo de isolamento e caracterização das amostras foi em relação ao preparo do meio CVP, que apresenta uma grande instabilidade

no que tange o pH da pectina o que é vagamente mencionado (CHARKOWSKI, 2015; DOS SANTOS, 2020). Por conta disso, foi estabelecido ajustes na preparação. Sendo assim, é necessário verificação e ajuste do pH da mistura B. O ajuste deve deixar a solução alcalina em valores próximos à 11,90. Isso deve ser efetuado antes da autoclavagem, uma vez que altas temperaturas levam a acidificação da pectina cítrica (SKIRVIN *et al.*, 1986). Por consequência, verificou-se a capacidade de armazenamento em refrigerador das soluções A e B. Desse modo, a mistura A pode ser mantida refrigerada por alguns dias e depois reaquecida, porém com a mistura B isso não é viável.

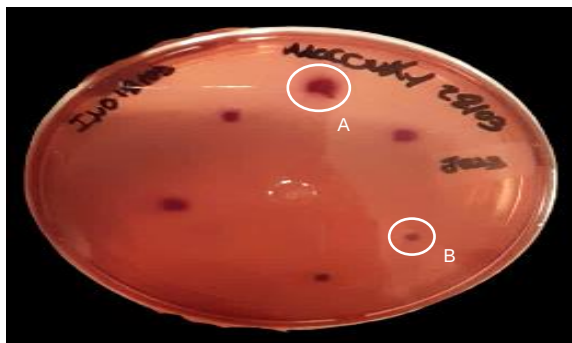
Tabela 3. Caracterização bioquímica e morfológica para *Pectobacterium* spp.

Nº	Hortalças	Inoculação Pimentão	Inoculação CVP	Inoculação MacConkey	Teste de Catalase	Gram – negativa
1	Cebola	-				
2	Tomate	+	-			
3	Tomate	-				
4	Cenoura	+	-	-		
5	Morango	+	-	-		
6	Morango	-				
7	Tomate	+	+		-	
8	Tomate	+	+	+	-	
9	Tomate	-			-	
10	Tomate	+	-			
11	Tomate	+	-			
12	Tomate	-				
13	Tomate	-				
14	Batata	+	-			
15	Tomate	+	-			
16	Batata	-				
17	Tomate	+	+	+	+	+
18	Pimentão	+	+			
19	Tomate	+				
20	Cenoura	-				
21	Tomate	-				
22	Tomate	-				
23	Cenoura	+	+	+		+
24	Pimentão	+	+	-		+
25	Tomate	+	+			-
26	Pepino	+	+			-

4.2 Isolamento de colônias puras

Foram isoladas, duas culturas bacterianas puras, classificadas como CVP-1e CVP-2. Ambas as culturas apresentaram alta capacidade de ocasionar podridão mole em hortaliças (tiras de pimentão verde saudável) antes e depois do congelamento das células bacterianas. Outro critério utilizado para o isolamento e conservação em glicerol dessas colônias, foi o resultado do crescimento de células no meio de cultura ágar MacConkey, que apresentou colônias de tamanho e coloração consideravelmente distintos após as 48h de incubação à 30°C (Figura 2), e também ambas apresentaram os melhores resultados no teste de catalase, quanto a formação de bolhas.

Figura 2. Culturas de células bacterianas em ágar MacConkey.



*Inoculações em crescimento na estufa em período de 24h à 30°C. Tendo como a região circulada A, correspondente ao isolado bacteriano CVP – 1, e o outra região circulada B, ao isolado CVP-2.

4.3 Armazenamento em Glicerol 15% das colônias puras

Assim determinou-se o isolamento das culturas puras de CVP-1e CVP-2 foi efetuado o armazenamento dessas amostras, com meio LB e glicerol 15% a uma temperatura de – 80°C. Após alguns dias do congelamento dessas cepas puras foi realizado um teste de viabilidade das colônias para determinar a capacidade de utilização desse material armazenado em estudos posteriores. Esse procedimento de praticabilidade do uso dessas células bacterianas pós-congelamento foi feito seguindo os procedimentos de isolamento descritos, ao final o processo mostrou-se eficaz. Por consequência, esse material poderá ser utilizado em outros estudos. Contudo, existe a necessidade de semear as culturas primordialmente em meios sem antifúngico, salvo o meio CVP – S2 modificado.

4.4 Extração de DNA e Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

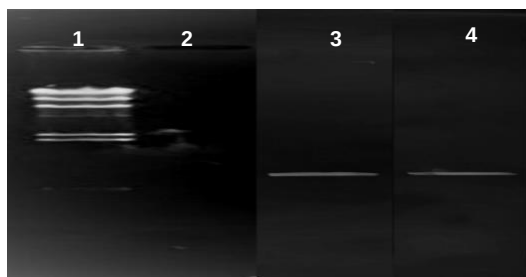
A extração de DNA das culturas puras isoladas, a Reação em Cadeia Polimerase (PCR) e a purificação dessas amostras apresentaram resultados satisfatórios, quando comparadas com o DNA padrão Lambda/HindIII. Todas as amostras de CVP-1e CVP-2 apresentaram aproximadamente um pouco menos de 2030 pb (figuras 3 e 4).

Figura 3. Resultados da Extração de DNA das culturas bacterianas puras.



*(1) DNA padrão lambda/hindIII; (2) DNA extraído da amostra isolada CVP-1; (3) DNA extraído da amostra isolada CVP-2.

Figura 4. Resultados da amplificação do DNA em Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) e Purificação.



*(1) DNA padrão lambda/hindIII; (2) controle negativo, vazio; (3) Amplicon purificado da amostra isolada CVP-1; (4) Amplicon purificado da amostra isolada CVP-2.

4.5 Sequenciamento gene 16S rRNA

Para corroborar que as culturas isoladas puras são provavelmente *Pectobacterium*, procedeu-se uma verificação molecular com a extração do DNA ribossomal e posterior amplificação do gene 16S pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com os primers universais 63f e 1837r (PATEL *et al.*, 2017). O produto do sequenciamento das duas culturas, resultou na produção de duas sequências contíguas, Contg.1 e Contg.2 (Tabela 2) pelo programa *CodonCode Aligner* 9.0. Quando essas informações das sequências foram inseridas na plataforma *Blast nucleotide*, essa comparou os dados submetidos com o banco de dados do Genbank, que indicou uma alta semelhança com as sequências do gene 16S rRNA com a de cepas de *Pectobacterium brasiliense* (sin. de *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense*),

Em função disso, tais análises resultaram nas informações contidas na Tabela 4, onde é possível verificar que o E – value (ou valor esperado) de todas as amostras corresponderam a 0.0, indicando que ambas as cepas isoladas pertencem ao gênero *Pectobacterium*. Além de exibirem uma alta taxa percentual (acima de 95%) de semelhança com cepas de *P. brasiliense* da indicando ambas as culturas isoladas puras são possivelmente desta espécie.

Tabela 4. Informações das sequências das cepas analisadas na plataforma *Blast nucleotide*.

Amostra	Grau de similaridade	Cepa	Acesso	E - value
CVP-1 (Pecto 1)	98.37%	IPO:4132 NAK:239	CP059956.1	0.0
	98.28%	AGPim1G	KY711431.1	0.0
	98.28%	NZEC1	JQ771053.1	0.0
	98.28%	212	NR_118224.1	0.0
CVP-2 (Pecto 2)	96.90%	Y52	KP187514.1	0.0
	96.82%	1692	CP047495.1	0.0
	96.82%	AGPim1G	KY711431.1	0.0
	96.82%	Y44	KP187509.1	0.0
	96.82%	Y14	KP187494	0.0
	96.82%	CCRMPB623	MT510117.1	0.0
	96.82%			0.0

*Resultados percentuais do grau de similaridade filogenética dos isolados puros CVP – 1(Pecto 1) e CVP- 2 (Pecto 2) em comparação outras cepas de *Pectobacterium*, obtidos após submissão na plataforma *Blast nucleotide*.

Destaca-se ainda que, pelas recentes análises moleculares de *Pectobacterium brasiliense*, essa espécie teria divergido evolutivamente da *P. carotovorum*. Manifestando então características genéticas suficientemente distintas da original (*P. carotovorum*), por

conta disso não poderia ser considerada apenas como uma subespécie, configurando-a logo como espécie (JOSHI *et al.*, 2021). Entretanto, algumas bibliográficas recentes (JARAMILLO; HUERTAS; GÓMEZ, 2017; ZACZEK-MOCZYDŁOWSKA *et al.*, 2019) mantiveram a antiga classificação dessa *Pectobacterium*, em caráter de subespécie, enquanto outros autores optaram pela nova nomenclatura taxonômica (PORTIER *et al.*, 2019; RIBEIRO, 2020). Esse dissentimento por sua vez leva a resultados conflituosos quando se analisa genomicamente as espécies do gênero *Pectobacterium*, conforme Ribeiro (2020) isso ocorre porque ambas as espécies, *P. carotovorum* e *P. brasiliense* são muito similares geneticamente e em questões de patogenicidade em hortaliças.

Desse modo, as duas cepas isoladas no decorrer desse estudo pertencem ao mesmo gênero de fitobactéria, *Pectobacterium* que possuem grande patogenicidade e relevância para a agricultura. Além de ser uma das cepas frequentemente isolada no mundo inteiro em inúmeros gêneros de hortaliças de grande valor econômico e de consumo (OULGHAZI *et al.*, 2022). Sendo reportado o isolamento de cepas de *P. brasiliense* no Brasil, em uma diversidade de espécies de hortaliças, incluindo o tomate (DE MORAES, 2018; RIBEIRO, 2020).

Ademais, em conformidade com a literatura (PORTIER *et al.*, 2019) a espécie de *Pectobacterium* apresenta alta eficiência no que concerne a taxa de transmissão e de adaptabilidade em diversos locais, no mundo todo essa fitobactéria apresenta alta capacidade de maceração dos tecidos vegetais (JARAMILLO; HUERTAS; GÓMEZ, 2017). Em vista disso, pode-se considerar que as culturas isoladas de CVP-1(Pecto 1) e CVP-2 (Pecto 2) apresentam todas as características estruturais, da forma, ação enzimática pectiolíticas que configuram uma pectobactéria de difícil controle. Considerando ainda Oulghazi *et al.* (2021) essa espécie de *Pectobacterium* tornou-se um transtorno de grandes proporções econômicas e de distribuição para a agricultura.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo dessa pesquisa foi isolar cepas *P. carotovorum* para estudos subsequentes com bacteriófagos. Duas cepas de *Pectobacterium* foram obtidas após a análise de 26 amostras de hortaliças com sintomas de podridão mole. A caracterização por testes bioquímicos, proposta no projeto inicial, foi substituída pela caracterização molecular. O sequenciamento do gene 16S rRNA das duas cepas e a análise dessas sequências pelo sistema *Blast nucleotide*, indicaram que as duas cepas são membros do gênero *Pectobacterium*. As amostras do banco de dados com maior similaridade com as cepas que isolamos eram amostras de *P. brasiliense*. Espécie essa que apresenta crescente relevância na agricultura devido à alta capacidade de transmissão e maceração dos tecidos, tal como a

espécie que pretendia-se isolar. As cepas puras foram armazenadas para estudos posteriores voltados para o biocontrole com bacteriófagos.

6. REFERÊNCIAS

ALINEJAD, F. et al. Screening of quorum-quenching bacteria associated with rhizosphere as biocontrol agents of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 53, n. 11-12, p. 509-523, 2020.

ALLEN, M. MacConkey agar plates protocols. **American Society for Microbiology**, 2005.

AUSUBEL, F. et al. Short protocols in molecular biology. **New York**, v. 275, p. 28764-28773, 1992.

BRENNER, D. FARMER III, J. Enterobacteriaceae. **Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria**, p. 1-24, 2015.

CARVALHO FILHO, R.; DE MELLO, S. *Pectobacterium carotovorum*: taxonomia, identificação, sintomatologia, epidemiologia e controle. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Docmentos (INFOTECA-E)**, 2008.

CHAHRAZADE, N. et al. Microbial soft rot of cultivated fruits and vegetables. **Algerian Journal Of Biosciences**, v. 1, n. 02, p. 37-45, 2020.

CHARKOWSKI, A. Biology and control of *Pectobacterium* in potato. **American Journal of Potato Research**, v. 92, n. 2, p. 223-229, 2015.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-4, 536, 1993.

CHOMCZYNSKI, P.; MACKEY, K. Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. **Analytical biochemistry**, v. 225, n. 1, p. 163-164, 1995.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CZAJKOWSKI, R. et al. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. **Plant pathology**, v. 60, n. 6, p. 999-1013, 2011.

DE MORAES, A. **Diversidade de bactérias causadoras de podridão mole em hortaliças no estado de Pernambuco**. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2018.

DOS SANTOS, A. et al. Isolamento e quantificação de *Pectobacterium* spp. em água de irrigação utilizando meio cristal violeta pectato. **Acta Biológica Catarinense**, v. 7, n. 3, p. 65-73, 2020.

DUAN, G. et al. The metabolic interplay between plants and phytopathogens. **Metabolites**, v. 3, n. 1, p. 1-23, 2013.

EL TASSA, S.; DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 620-625, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (Org.). The State of Food and Agriculture 2019: Moving forward on food loss and waste reduction. **FAO**, p. 182, 2019.

FILIMON, M. et al. The effects of difenoconazole treatment on microorganism from soil. **communities**, v. 14, n. 17, p. 20, 2018.

GARCIA, P. et al. Bacteriophages and their application in food safety. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 6, p. 479-485, 2008.

HYMAN, L.; TOTH, I.; PÉROMBELON, M. Isolation and identification. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Invergowrie: **Scottish Crop Research Institute Annual Report**, v.10, p.60-65, 2002.

JARAMILLO, A.; HUERTAS, C. A.; GÓMEZ, E. D. First report of bacterial stem rot of tomatoes caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Colombia. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 830, 2017.

JAYANI, R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

JOSHI, J. et al. Metabolites from wild potato inhibit virulence factors of the soft rot and blackleg pathogen *Pectobacterium brasiliense*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p. 100-109, 2021.

KERING, K.; KIBII, B.; WEI, H. Biocontrol of phyto-bacteria with bacteriophage cocktails. **Pest management science**, v. 75, n. 7, p. 1775-1781, 2019.

LIM, J. et al. Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using bacteriophage PP1. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 1147-1153, 2013.

MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Long-term stability of RNA isolation reagents. **J NIH Res**, v. 8, p. 72, 1996.

MACWILLIAMS, Maria P.; LIAO, Min K. Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. ASM MicrobeLibrary. **American Society for Microbiology**, v. 2006, 2006.

MAISURIA, V.; NERURKAR, A. Biochemical properties and thermal behavior of pectate lyase produced by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* BR1 with industrial potentials. **Biochemical engineering journal**, v. 63, p. 22-30, 2012.

MANSFIELD, J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012.

MARCONATTO, L.; KOEHLER, H.; MARCUZZO, L. Incidência de doenças em cebola armazenada na região do alto vale do Itajaí/SC. **Summa phytopathol**, Botucatu, v. 43, n. 3, p. 243-245, Sept. 2017

MARTINS, P. et al. Persistence in phytopathogenic bacteria: do we know enough?. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1099, 2018.

MOYES, R.; REYNOLDS, J.; BREAKWELL, D. Differential staining of bacteria: gram stain. **Current Protocols in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. A. 3C. 1-A. 3C. 8, 2009.

MUTURI, P. et al. Bacteriophages isolated in China for the control of *Pectobacterium*

carotovorum causing potato soft rot in Kenya. **Virologica Sinica**, v. 34, n. 3, p. 287-294, 2019.

OPARA, E.; ASUQUO, A. An overview of characterization and identification of soft rot bacterium Erwinia in some vegetable crops. **Greener Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 046-055, 2016.

OULGHAZI, S. et al. Pectobacterium brasiliense: Genomics, host range and disease management. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 106, 2021.

PATEL, R. et al. Exploration of using antisense peptide nucleic acid (PNA)-cell penetrating peptide (CPP) as a novel bactericide against fire blight pathogen Erwinia amylovora. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 687, 2017.

PORTIER, P. et al. Elevation of Pectobacterium carotovorum subsp. odoriferum to species level as Pectobacterium odoriferum sp. nov., proposal of Pectobacterium brasiliense sp. nov. and Pectobacterium actinidiae sp. nov., emended description of Pectobacterium carotovorum and description of Pectobacterium versatile sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 69, n. 10, p. 3207-3216, 2019.

RALET, M.; LEROUGE, P.; QUÉMÉNER, B. Mass spectrometry for pectin structure analysis. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 14, p. 1798-1807, 2009.

RIBEIRO, B. **Genômica comparativa de espécies de Pectobacterium causadoras de podridão mole**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2020.

SINGH, D.; SHARMA, R. Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. In: **Postharvest disinfection of fruits and vegetables**. Academic Press, p.1-52, 2018.

SKIRVIN, R. et al. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v. 5, n. 4, p. 292-294, 1986.

TUMELERO, A. **Identificação e quantificação de Pectobacterium sp. em tubérculo-semente de cultivares de batata**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Rio grande do Sul, 2003.

VERZIGNASSI, J. et al. Podridão-mole (Erwinia carotovora) em couve no Pará. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO PET, 2., 2007, Belém, PA. Iniciação científica e a formação profissional: anais. Belém, PA: PROEN/UFRA, 2007.

WALKER, S.; LORSCH, J. Sanger dideoxy sequencing of DNA. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 171-184, 2013.

WASANA, W. et al. Antimicrobial activity of selected spices against Pectobacterium carotovorum isolated from some vegetables in Sri Lanka. **Journal of Science of the University of Kelaniya Sri Lanka**, v. 12, 2019.

ZACZEK-MOCZYDŁOWSKA, M. et al. Pectobacterium and Dickeya species detected in vegetables in Northern Ireland. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, n. 3, p. 635-647, 2019.

Contatos: casi.donelli@gmail.com e joseluiz.wolff@gmail.com