



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS  
BACHARELADO EM AGRONOMIA**

**HENARA VALÉRIA MIRANDA CASTRO**

**ETIOLOGIA DA PODRIDÃO MOLE DE HORTALIÇAS  
NA REGIÃO OESTE DO PARÁ, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de graduação em  
Agronomia para obtenção do título de  
Bacharel em Agronomia; Universidade  
Federal do Oeste do Pará, Instituto de  
Biodiversidade e Floresta.  
Orientador Prof. Dr. Robinson Severo.  
Co-orientador Prof. Dr. Marco Aurélio  
Siqueira da Gama

**SANTARÉM  
2021**

**HENARA VALÉRIA MIRANDA CASTRO**

**ETIOLOGIA DA PODRIDÃO MOLE DE HORTALIÇAS  
NA REGIÃO OESTE DO PARÁ, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de graduação em Agronomia para obtenção do título de Bacharel em Agronomia; Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Floresta.  
Orientador Prof. Dr. Robinson Severo.  
Co-orientador Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

C355e Castro, Henara Valéria Miranda  
Etiologia da prodridão mole de hortaliças na Região Oeste do Pará./ Henara Valéria Miranda Castro. – Santarém, 2021.  
56 p.: il.  
Inclui bibliografias.

Orientador: Robinson Severo.

Coorientador: Marco Aurélio Siqueira da Gama.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Curso Bacharelado em Agronomia.

1. Enterobacteriaceae. 2. Caracterização cultural. 3. Patogenicidade. I. Severo, Robinson, *orient.* II. Gama, Marco Aurélio Siqueira da, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 635.098115

**HENARA VALÉRIA MIRANDA CASTRO**

**ETIOLOGIA DA PODRIDÃO MOLE DE HORTALIÇAS NA REGIÃO  
OESTE DO PARÁ, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de graduação em Agronomia para obtenção do título de Bacharel em Agronomia; Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Floresta.  
Orientador Prof. Dr. Robinson Severo.  
Co-orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

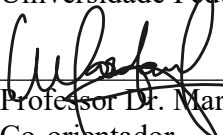
Conceito: 9,6

Data de Aprovação: 16 / 12 / 2021

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Robinson Severo

Orientador

Universidade Federal do Oeste do Pará

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Co-orientador

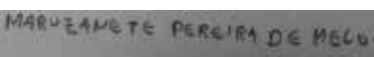
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

*Elineide Barbosa de Souza*

\_\_\_\_\_  
Professora Dra. Elineide Barbosa de Sousa

1ª Examinadora

Universidade Federal Rural de Pernambuco

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Maruzanette Pereira de Melo

2ª Examinador

Universidade Federal do Piauí.

Dedico a toda a minha família, *in memoriam* a Rosilene Gomes, Moacir Filho e a todos aqueles que torciam por este sonho e não puderam vê-lo se realizar.  
Amarei vocês para sempre!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus.

A Universidade Federal do Oeste do Pará, e à Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Aos horticultores que permitiram a realização do trabalho em suas hortas.

Ao Prof. Dr. Robinson Severo, que pacientemente dividiu comigo seu conhecimento e me orientou, assim como, aos seus orientados do laboratório de Fitopatologia da Ufopa, em especial agradeço ao amigo Leandro Shibutani, com quem pude partilhar mais tempo e experiências.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama, e seus orientados no LAFIBAC-UFRPE, em especial a Vitória Oliveira, que dividiu sua residência comigo durante o estágio.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Aledi, que apoiou dentro da universidade os meus primeiros passos, e a seus orientados pela parceria e amizade.

Aos meus pais (Odinéia e Henrique), avós (Odília e Raimundo; Raimunda e Jesus) e familiares, pois a dedicação diária, carinho e garra de vocês sempre foram minha motivação

Aos meus irmãos Heloisa Castro e Emanuel Miranda por alegrarem a minha vida e serem minha inspiração, desejo-lhes tanto sucesso quanto possam imaginar!

Aos amigos (as) e namorado pelo carinho, apoio e incentivo, desejo-lhes bons ventos para suas jornadas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu fosse capaz de realizar este Trabalho de Conclusão de Curso e não foram aqui nomeados, uma grande “OBRIGADA!”.

*As plantas (tão suscetíveis) ao se proteger formando áreas de embolia, se sufocam caminhando uma direção infeliz e ineficaz, frente ao patógeno “esperto”. Deixando assim triste o agricultor, que mesmo sem entender nada da vida delas, vive o luto da sua partida.*

*(Autorial)*

## RESUMO

Devido a carência de informações sobre os agentes etiológicos da podridão mole na região oeste do Pará, foi realizada a caracterização e análise da variabilidade cultural, fitopatogênica e da diversidade genética de isolados bacterianos obtidos de coletas de hortaliças com sintomas da doença em hortas comerciais de Belterra, Santarém e Mojuí dos Campos no ano de 2019, com o objetivo de caracterizar os isolados quanto a diversidade cultural, patogênica e molecular. Foi realizado o método de isolamento semi-seletivo utilizando frutos pimentão com posterior cultivo das bactérias em meio de cultura CPG (Caseína, Peptona e Glicose). As colônias obtidas foram caracterizadas e preservadas em água destilada e esterilizada. Foram obtidos 75 isolados, sendo as características culturais mais frequentes a forma circular (70 %), elevação convexa (52 %), estrutura rugosa (66 %), aspecto de vidro estilhaçado (73 %), brilho translúcido (90 %), cor creme (74 %) e consistência úmida (90 %), sendo equivalentes os bordos lobados (47 %) e ondulados (45 %), características semelhantes a espécies do gênero *Pectobacterium*, *Dickeya* e outros dentro da família *Enterobacteriaceae*. Por meio de análise euclidiana utilizando-se o método UPGMA, com base na variabilidade cultural os isolados foram diferenciados em 29 tipos culturais, sendo que 17 isolados não formaram agrupamento e o maior grupo obtido abrigou 18 isolados, o que caracteriza uma alta diversidade cultural dos isolados neste estudo. Quanto a patogenicidade, foram formados cinco grupos, dos quais 77 % dos isolados se caracterizaram como patogênicos a batata, pimentão, cebola e cenoura, o que mostra uma falta de especificidade dos isolados da região. Foram selecionados 38 isolados para a realização das análises moleculares utilizando REP, ERIC e BOX - PCR, que foram agrupados utilizando o método UPGMA e análise de Jaccard para a formação dendrograma. Verificou-se alta variabilidade genética das isolados, com 35 grupos genéticos à 70 % de similaridade. Observadas a variabilidade cultural, patogênica e genética, concluímos que existe a possibilidade de haver mais de uma espécie ou gênero bacteriano causando podridão mole na região oeste do Pará. Desta forma, são necessárias novas investigações por meio de análises moleculares para elucidar os gêneros e espécies envolvidos na podridão mole em hortaliças na região Oeste do Pará.

**Palavras-chave:** Enterobacteriaceae. Caracterização Cultural. Patogenicidade. Diversidade genética.

## ABSTRACT

Due to the lack of information on the etiological agents of soft rot in the western region of Pará, the characterization and analysis of the cultural, phytopathogenic and genetic diversity of bacterial isolates obtained from collections of vegetables with symptoms of the disease in commercial gardens in Belterra was carried out, Santarém and Mojuí dos Campos in 2019, with the aim of characterizing the isolates in terms of cultural, pathogenic, and molecular diversity. The semi-selective isolation method was carried out using pepper fruits with subsequent cultivation of the bacteria in CPG culture medium (Casein, Peptone, and Glucose). The colonies obtained were characterized and preserved in distilled and sterilized water. A total of 75 isolates were obtained, with the most frequent cultural characteristics being the circular shape (70 %), convex elevation (52 %), rough structure (66 %), shattered glass appearance (73 %), translucent shine (90 %), color cream (74%) and moist consistency (90%), with equivalent lobed (47%) and wavy (45%) edges, characteristics like species of the genus *Pectobacterium*, *Dickeya* and others within the family Enterobacteriaceae. By means of Euclidean analysis using the UPGMA method, based on cultural variability, the isolates were differentiated into 29 cultural types, with 17 isolates not forming a cluster and the largest group obtained sheltered 18 isolates, which characterizes a high cultural diversity of the isolated in this study. As for pathogenicity, five groups were formed, of which 77% of the isolates were characterized as pathogenic to potatoes, peppers, onions, and carrots, which shows a lack of specificity of the isolates in the region. Thirty-eight isolates were selected for molecular analysis using REP, ERIC, and BOX - PCR, which were grouped using the UPGMA method and Jaccard analysis for dendrogram formation. There was high genetic variability of the isolates, with 35 genetic groups at 70% similarity. Observing the cultural, pathogenic, and genetic variability, we concluded that there is a possibility that there is more than one bacterial species or genus causing soft rot in the western region of Pará. Thus, further investigations through molecular analyzes are necessary to elucidate the genera and species involved in soft rot in vegetables in the western region of Pará.

**Keywords:** Enterobacteriaceae. Cultural characterization. Pathogenicity. Molecular diversity.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO 1 - VARIABILIDADE CULTURAL DE ISOLADOS BACTERIANOS CAUSADORAS DE PODRIDÃO MOLE EM HORTALIÇAS NA REGIÃO OESTE DO PARÁ, BRASIL .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Introdução .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Revisão bibliográfica .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Bactérias causadoras de podridão mole .....	14
1.2.2 Danos .....	17
1.2.1.4 Variabilidade cultural e identificação .....	18
<b>1.3 Material e métodos .....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Coleta das plantas com sintomas de podridão mole .....	20
1.3.2 Isolamentos, purificações e conservação de isolados .....	23
1.3.2 Caracterização cultural das colônias dos isolados .....	24
<b>1.4 Resultados e discussão .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5 Conclusões .....</b>	<b>34</b>
<b>1.6 Referências .....</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 2 - VARIABILIDADE PATOLÓGICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS BACTERIANAS CAUSADORAS DE PODRIDÃO MOLE EM HORTALIÇAS NA REGIÃO OESTE DO PARÁ, BRASIL .....</b>	<b>41</b>
Abstract .....	42
Resumo .....	43
Nota científica .....	43
Agradecimentos .....	46
Declaração de conflito de interesses .....	47
Contribuição dos autores .....	47
Referências .....	47
Tabela 1 - Grupos de patogenicidade de isolados de bactérias causadoras de podridão mole de acordo com a reação aos diferentes hospedeiros .....	50

Figura 1 - Dendrograma baseado no Método de Grupos de Pares Não Pareados com Média Aritmética, de acordo com os perfis gerados por REP, ERIC e BOX-PCR mostrando a relação entre isolados de bactérias causadoras de podridão mole obtidas de diferentes vegetais cultivados na região oeste do Estado do Pará .....	51
Orcid .....	52
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>57</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Bactérias causadoras de podridão mole são patógenos cosmopolitas cujos danos ainda não foram totalmente dimensionados para todos os hospedeiros. Devido a alta diversidade de microrganismos causadores dessa doença (PORTE & MAIA, 2001), a identificação dos agentes causais demanda a utilização de diferentes técnicas, que por vezes, não podem ser realizados nos municípios do oeste do Pará. Assim, o que é coletado é levado a outras regiões para análises, o que torna oneroso e demorado o processo de identificação da doença.

Nessa região, os olericultores, extensionistas e assistentes técnicos dos municípios de Belterra, Mojuí dos Campos e Santarém demonstraram não conhecer o agente causal da podridão mole (SEVERO & SAGAMA, 2019), conseqüentemente, enfrentam problemas em adotar medidas de controle eficientes, o que pode gerar prejuízos aos olericultores. Muller *et al.* (2009) afirma que falhas na identificação de doenças são descritas como fator limitante para o controle, gerando danos a produção e ao comércio dos produtos vegetais.

Através das atividades de aulas práticas em campo, de pesquisa e extensão, desenvolvidas pelos professores e alunos das disciplinas de fitopatologia, estagiários do Laboratório de Fitopatologia e bolsistas de PET, PIBIC, PIBEX e PRÓ-ENSINO, as quais encontram-se registradas na forma de relatórios apresentados e aprovados pelos gestores competentes da UFOPA (LEITE; SEVERO; MELLO, 2017; MELLO; SEVERO; LEITE, 2017; SEVERO & SHIBUTANI, 2019) é possível identificar de forma preliminar o panorama da doença no oeste do Pará.

A podridão mole tem ocorrido nas hortas desta região em alta incidência e severidade, causando danos às plantas e perdas significativas aos olericultores. Observa-se redução no tamanho e quantidade de produtos comercializáveis, os sintomas são observados em vários hospedeiros (couve-folha, repolho, salsa, cebolinha, chicória do Pará, tomate, pimentão, berinjela) e a ocorrência é generalizada nas hortas dos três municípios, o que a torna uma doença com caráter epidêmico (Comunicação pessoal, 12 de dezembro de 2019)<sup>1</sup>.

Diante desse quadro, esta pesquisa objetivou identificar morfológicamente os isolados causadores de podridão mole em hortaliças na região Oeste do Pará, estudar a variabilidade cultural, fitopatogênica e molecular dos isolados provenientes da região Oeste do Pará.

---

<sup>1</sup> Comunicação pessoal relatada pelo produtor rural durante a visita técnica a sua horta, em Santarém-PA, 2019.

## CAPÍTULO 1

### VARIABILIDADE CULTURAL DE ISOLADOS BACTERIANAS CAUSADORAS DE PODRIDÃO MOLE EM HORTALIÇAS NA REGIÃO OESTE DO PARÁ, BRASIL

#### 1.1 INTRODUÇÃO

O estudo das células começou ainda no século XVII, junto com a invenção do microscópio. Os pequenos “animálculos” observados por Leeuwenhoek, viriam a ser identificados posteriormente como bactérias ou protozoários. Os estudos evoluíram, assim como a forma de estudar esses microrganismos, e Robert Koch veio a criar as primeiras soluções nutritivas para o cultivo de microrganismos (NÓBREGA & BOSSOLAN, 2010).

A identificação cultural de colônias sucede a criação de meios de cultura sólidos, Foram desenvolvidos meios de cultura seletivos, semisseletivos, diferenciadores, entre outros, voltados principalmente a identificação de microrganismos humanos, até 1970, quando Kado e Heskett desenvolveram meios de cultura diferenciadores voltados para os principais gêneros bacterianos causadores de doenças de plantas conhecidos até então: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (NÓBREGA & BOSSOLAN, 2010).

Dentro da identificação de bactérias causadoras de podridão mole, o meio caseína-peptona-glicose desenvolvido por De Boer & Kelman (2001), permite a identificação preliminar de gêneros, tais como *Pectobacterium* (DUARTE & EL-TASSA, 2003), *Dickeya* (ALIČ et al., 2017), *Pantoea* (MORALE-VALENZUELA et al., 2007; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001) e *Burkholderia* (JEONG et al., 2003; SARKAR & CHAUDHURI, 2015; KARKI et al., 2012).

A escassez de estudos que caracterizem de forma mais detalhada as colônias bacterianas, competem para a conclusão de resultados preliminares incoerentes e que podem dificultar o controle das podridões moles em hortaliças. Atualmente, os principais gêneros causadores da podridão mole citados são *Dickeya* e *Pectobacterium* (MANSFIELD et al., 2012), mas estudos sugerem uma alta complexidade taxonômica das bactérias associadas a doença no Nordeste e Norte do Brasil (MORAES, 2018; CARDOSO, 2019)

Observada a importância da doença e a escassez de resultados para caracterização cultural de fitobactérias causadoras de podridão mole para a região oeste do Pará, objetivou-se com esse capítulo realizar a caracterização cultural das isolados bacterianos obtidos nos municípios de Belterra, Mojuí dos Campos e Santarém.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Bactérias causadoras de podridão mole

Os primeiros relatos da podridão mole incitada por bactérias datam de 1850, quando o químico Eilhardt Mitscherlich realizou a identificação de um “víbrio” que tinha capacidade de macerar os tecidos de batata-inglesa (ROMEIRO, 2005), até hoje, os agentes causais de podridão mole e talo-oco são relacionados a capacidade de hidrolisar substâncias pécticas da parede celular dos vegetais (FÉLIX, 2012).

A hidrólise de substâncias pécticas pode ser realizada por meio das enzimas pectinolíticas ou pectinases (pectina metil esterase, protopectinases, endopoligalacturonase, exopoligalacturonase, exopoligalacturonano-digalacturono hidrolase, oligogalacturonano hidrolase, A4-5 oligogalacturonano insaturada hidrolase, endopolimetil-galacturonases, endopoligalacturonase liase, exopoligalacturonase liase, oligo-D-galactosiduronato liase, endopolimetil-D-galactosiduronato liase e exopolimetil-D-galactosiduronato liase). A produção dessas enzimas consiste na estratégia de bactérias e outros organismos de obter alimento (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Em *D. chrysanthemi* (syn. *Erwinia chrysanthemi*), a secreção de enzimas degradadoras da parede celular é tão importante para virulência que conjuntos alternativos de enzimas atuam quando há falha na produção das pectato-liases e poligaracturonases (KELLEMMU et al., 1993).

O mecanismo responsável pela liberação dessas enzimas é chamado sistema de secreção tipo II (HERRON et al, 2000; HU et al, 1992; SALMOND & REEVES, 1993), presente tanto nas bactérias que expressam relação parasítica ou saprofítica as plantas, como exemplo os gêneros *Xanthomonas* (MOHAMMED; ABDALLA; RAHIM, 2021; HOMEM, 2008) e *Pseudomonas* (HAYASHI et al., 1997; MACAGNAN et al., 2007; MOUAYED; WARDY; SEDEEQ, 2019), quanto em parasitas acidentais como *Klebsiella* (HAY et al, 2018) ou não parasitas de plantas como exemplo o gênero *Escherichia* (AMANAT et al, 2019; HAY et al, 2018).

O sequenciamento do genoma de bactérias Gram-negativas sugere que a presença desse sistema ocorra nas classes de: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteriae* e *Deltaproteobacteria*, mas apesar da presença desse sistema nem todas as bactérias tem o sistema funcional (Figura 1) (CIANCIOOTTO & WHITE, 2017), ou seja, são incapazes de causar maceração de tecidos vegetais.



O gênero *Pectobacterium* foi descrito por Waldee em 1945 (SKERMAN et al., 1980). A primeira espécie descrita tem como basônimo não validamente publicado o nome *Bacillus carotovorus* (JONES, 1901) e como sinônimo válido *Pectobacterium*. O epíteto específico “*carotovorum*” permaneceu em uma das espécies do gênero e significa “devorador de cenouras” devido a capacidade de consumir os tecidos desse vegetal. A partir daí estudos foram realizados e novas espécies foram descritas, e atualmente, o gênero possui 22 espécies e seis subespécies validadas, além de cinco espécies que aguardam validação (LPSN, 2021).

*Pectobacterium*, apesar da sua distribuição mundial, as regiões temperadas favorecem o desenvolvimento de isolados de *P. atrosepticum*, enquanto nas regiões temperadas há uma maior relação entre a podridão mole e as espécies *P. carotovorum* e *P. brasiliense* (DUARTE & EL-TASSA, 2004; HAAN et al., 2008).

O gênero *Dickeya* foi atribuído em substituição ao complexo *Erwinia chrysanthemi* (SAMSON et al., 2004) e atualmente distribui-se em 13 espécies e 2 sub-espécies (LPSN, 2021), as quais foram descobertas recentemente em superfície de rios e na rizosfera de *Solanum dulcamara* sem causar sintomas da doença, o que indica a alta capacidade de adaptação da bactéria ao ambiente. Até agora a espécie nomeada, *D. lacustris*, não foi relatada como patogênica, entretanto, foi comprovada a sua atividade pectolítica em meio cristal-violeta-pectato (UGOUVIEUX-COTTE-PATTAT et al., 2019).

*Dickeya* apresenta distribuição semelhante a *Pectobacterium* (TOTH et al., 2021), mas além da diferenciação espacial, estudos recentes demonstram que as bactérias dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya* tem diferenciado as suas populações de acordo com o tempo (VAN DER WOLF et al., 2016) onde mesmo em climas temperados está havendo o fortalecimento da ocorrência de *P. brasiliense* e *D. solani* no lugar das espécies *P. atrosepticum* e *D. dianthicola*.

*Pectobacterium* e *Dickeya* juntas são os gêneros com maior gama de hospedeiros, em literatura 21 famílias de dicotiledôneas e 16 de monocotiledôneas são suscetíveis a estas espécies (MA et al., 2017), em trabalhos recentes as hortaliças das famílias das Solanáceas (batata-inglesa, tomateiro, pimentão, beringela), Curcubitáceas (pepino, abobrinha e melão), brássicas (repolho, couve-chinesa, rábano, couve-folha, brócolis), Asteráceas (alface e alcachofra), Liliáceas (cebola, cebolinha e alho), Apicáceas (cenoura e coentro) e Amarantáceas (Beterraba).

Apesar de bem definidos, os dois gêneros não são os únicos capazes de incitar a podridão mole em hortaliças, em relatos mais antigos descreve-se a ocorrência de *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Clostridium* associadas a doença (LOPES & HENZ, 1998). Atualmente, há no Brasil estudos que evidenciam a grande diversidade de Enterobactérias

causadoras de podridão mole, as quais em levantamentos realizados em Pernambuco indicam que espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Rahnella* e *Raoutella* estão relacionados à doença (MORAES, 2018) assim como em estudos com isolados do Pará foi constatada a associação entre *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Raoutella* e *Klebsiella* (CARDOSO, 2019).

No Brasil, já foi relatada podridão mole causada por diferentes agentes etiológicos em alface, repolho chinês (BARROSO et al., 2021) cenoura (ROMEIRO et al., 1988), plantas ornamentais (ALMEIDA et al., 1994; ALMEIDA et al., 1997), coentro (ROMEIRO et al., 1994), cebolinha (BOFF, 1996; HALFFED-VIEIRA & NECHET, 2008), batata (OLIVEIRA et al., 2003; MACAGNAN et al., 2007), mandioquinha salsa (HENZ et al., 2006), tomate (GOMES et al., 2005), alho (MACAGNAN et al., 2008), couve-chinesa (MELLO et al., 2011), couve-folha (GAMA et al., 2017) e em pimentão (SILVA et al., 2014). No Pará, estudos já identificaram podridão mole em couve-folha (VERGINASSI et al., 2007; CARDOSO, 2019), abacaxizeiro, açaizeiro, almeirão, alface, salsa, jambu, caruru e pitaya (CARDOSO, 2019).

### 1.2.2 Danos

Os danos comuns incitados pela podridão mole às hortaliças são a diminuição da disponibilidade de partes vegetativas ou reprodutivas para comercialização, devido a capacidade que a doença tem de afetar diretamente os órgãos de interesse comercial, e indiretamente quando se estabelece na região radicular ou do colo, impedindo a condução de água e nutrientes para a parte de interesse econômico (CHARKOWSKI, 2018).

A podridão mole causada por *P. brasiliense* desde 2004 foi a principal causadora de perdas contabilizadas em batata (*Solanum tuberosum* L.) na região da Europa, Ásia e África. Somente na Bélgica em 2018 houve perda de 63.914 milhões de dólares e incidência de 70 % da doença nos campos (OULGHAZI et al., 2021).

Coletas realizadas em regiões da china com plantio de pepino estimam que a incidência de *P. brasiliense* esteja em torno de 15 a 50 % das propriedades, e são responsáveis por 20 a 30 % da diminuição da produção, Meng et al. (2017) identificou isolados de *P. brasiliense* causando sintomas de gomose, podridão mole e pontos amarelos em frutos, caules e folhas respectivamente.

Na Europa existem legislações rigorosas capazes de desclassificar lotes inteiros de batata inglesa para plantio, enquanto nos Estados Unidos há incentivo a identificação e quantificação da podridão mole na produção de batata no país. Em 2007, Vanderwolf et al.,

estudando isolados de *Dickeya* spp. identificou que a presença de 40 células bacterianas em um grama de tecido de batata era suficiente para causar diminuição da produção entre 15 e 30 % no campo. No Egito, 23,8 % dos danos a batata causado pela podridão mole tiveram como agente causal *Pectobacterium* sp., 30,9 % *Bacillus* sp., 11,9 % *Dickeya* e 33,3 % por duas isolados de *Pseudomonas* (EL-HABBAK et al., 2019).

No Brasil, há registro de controle de patógenos pertencentes ao gênero *Dickeya* e *Pectobacterium* somente na importação de orquídeas (INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1, DE 7 DE JANEIRO de 2015). Apesar de fazerem parte do top dez das principais bactérias patogênicas a plantas (MANSFIELD et al., 2012), a mensuração das perdas causadas bactérias pectinolíticas em hortaliças ainda não foi estabelecida.

### 1.2.3 Variabilidade cultural e identificação de bactérias causadoras de podridão mole

O cultivo e observação de colônias bacterianas em meio de cultura é rotina em laboratórios. Por meio das características culturais é possível diferenciar os grupos taxonômicos que estão sendo estudados de forma preliminar (MACEDO et al, 2017) e ainda auxiliar na decisão de escolha das amostras que serão submetidas a avaliação de diversidade em análises moleculares (NAVROSKI et al., 2015).

A alta variedade de meios de cultura e as diferentes respostas fenotípicas das colônias bacterianas aos meios até hoje configuram um desafio para os profissionais que convivem com a rotina laboratorial (SOUSA et al., 2013). O desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação permitiu rapidez e precisão na identificação dos agentes causais de doenças bacterianas (GANDRA et al., 2008), entretanto, não substituiu completamente as técnicas de identificação por meio das características culturais, o que torna necessária a produção de trabalhos que identifiquem as principais características das culturas bacterianas.

Para bactérias causadoras de podridão mole diferentes meios foram propostos para facilitar a identificação, convém citar o meio seletivo de Miller-Schorth modificado (PIERCE & MMCCAIN, 1992 apud. BOKAR, 2017) e o meio semi-seletivo cristal violeta pectato (BDLIA & LANGERFELD, 2005 apud. BOKAR, 2017). Atualmente a combinação do isolamento semi-seletivo em pimentão (TAKATSU et al., 1981), com o meio Caseína, peptona e glicose (CPG) (Kelman & Dickey, 1995), aparentam ser os principais utilizados para realizar o isolamento de colônias de bactérias causadoras de podridão mole, pois possibilitam diminuir as taxas de microrganismos saprófitas e oportunistas durante o isolamento do agente causal (ROMEIRO, 2001), além disso, o meio CPG é utilizado para reativação, repique e produção

massal de inóculo bacteriano (MÉJIA – SÁNCHEZ et al., 2019; SILVA et al., 2012; GUERRA et al., 2014).

As principais características do gênero *Pectobacterium* observadas no meio de cultura CPG são a presença do aspecto de vidro quebrado sob luz oblíqua (ALVARADO et al., 2011; BARROSO et al., 2019; DUARTE & ELTASSA, 2003; MORAES et al., 2016; QUEIROZ et al., 2017) e a cor branca ou creme com bordos irregulares (DUARTE & ELTASSA, 2003; ELAEH & MOHSEN, 2007) como observado no quadro 1.

**Quadro 1** – Principais características em meio de cultura caseína, peptona e glicose (CPG) em diferentes gêneros bacterianos

Gêneros bacterianos	Principais características em meio de cultura CPG	Autores
<i>Pectobacterium</i>	Aspecto de vidro estilhaçado sob luz oblíqua, cor creme e bordos irregulares	ALVARADO et al., (2011) BARROSO et al. (2019) DUARTE & ELTASSA (2003) MORAES et al. (2016) QUEIROZ et al. (2017) ELAEH & MOHSEN (2007)
<i>Pectobacterium, Kluyvera, Klebsiella, Morganella, Providencia, Rahnella, Raoutella e Cronobacter</i>	Aspecto de vidro estilhaçado sob luz oblíqua	MORAES et al. (2016)
<i>Burkholderia</i>	Cor branca ou marrom, bordos lisos	JEONG et al., (2003) SARKAR & CHAUDHURI (2015) KARKI et al. (2012)
<i>Dickeya</i>	Aspecto de ovo frito	ALIC et al. (2017)

**Fonte:** Adaptado pelos autores.

Para os gêneros *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoutella* e *Cronobacter*, não foram encontradas em literatura descrições detalhadas das características culturais em CPG, entretanto, na pesquisa de MORAES (2018) todas as colônias que foram cultivadas neste meio e foram selecionadas para o estudo tinham o aspecto de vidro quebrado, e mesmo assim, as análises moleculares da região 16S rDNA identificaram, mesmo que em menor porcentagem, gêneros e espécies diferentes de *Pectobacterium*.

### 1.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 1.3.1 Coleta de plantas com sintomas de podridão mole

Foram realizadas 12 visitas técnicas no período de 1 outubro à 21 de dezembro de 2019, em hortas comerciais nos municípios de Belterra, Mojuí dos Campos e Santarém, região oeste do Pará (Quadro 2). Em cada local foram observadas as espécies cultivadas e identificadas plantas com sintomas de podridão mole. Para coleta das amostras nas áreas foi realizado o caminhamento em zigue-zague e as plantas sintomáticas foram fotografadas e coletadas para a realização do isolamento do agente causal.

**Quadro 2** - Identificação de isolados, hospedeiros e locais de amostragens das hortaliças com sintomas de podridão mole

(continua)

Nº iso. <sup>1</sup>	Cód. Iso. <sup>2</sup>	Hospedeiros	Mun. /Com. <sup>3</sup>	Coordenadas geográficas
1	ALF <sup>4</sup> 1 <sup>5</sup> .1 <sup>6</sup>	<i>Latuca sativa</i> L.	STM. <sup>7</sup> – Tb. <sup>8</sup>	2°37'09.6"S; 54°44'03.6"W
2*	ALF 1.2	<i>L. sativa</i> L.	STM. – Tb.	
3	ALF 1.3	<i>L. sativa</i> L.	STM. – Tb.	
4*	ALF 1.4	<i>L. sativa</i> L.	STM. – Tb.	
5*	ALF 2.1	<i>L. sativa</i> L.	STM. – S.R. <sup>9</sup>	2°38'15.0"S; 54°43'56,7"W
6	ALF 3.1	<i>L. sativa</i> L.	STM. – E.N. <sup>10</sup>	2°38'02.1"S; 54°55'29.2"W
7*	ALF 3.2	<i>L. sativa</i> L.	STM. – E.N.	
8*	ALF 4.1	<i>L. sativa</i> L.	M.C. <sup>11</sup> . – M.P. <sup>12</sup>	2°38'12.9"S; 54°43'03.1"W
9*	ALF 4.3	<i>L. sativa</i> L.	M.C. – M.P.	
10*	ALF 4.4	<i>L. sativa</i> L.	M.C. – M.P.	
11	ALF 4.5	<i>L. sativa</i> L.	M.C. – M.P.	
12	CEB <sup>13</sup> 1.1	<i>Allium schoenoprasum</i> L.	STM. – Tb.	2°37'09.6"S; 54°44'03.6"W
13	CEB 2.1	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – Tb.	2°37'09.6"S; 54°44'03.6"W
14	CEB 2.2	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – Tb.	
15	CEB 2.3	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – Tb.	
16*	CEB 3.4	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – A.V. <sup>14</sup>	2°26'59.6"S; 54°41'16.1"W
17*	CEB 3.6	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – A.V.	
18	CEB 3.6-2 <sup>15</sup>	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – A.V.	
19*	CEB 3.9	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – A.V.	
20	CEB 3.9-2	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – A.V.	
21*	CEB 3.10	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – A.V.	
22	CEB 3.10-1	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – A.V.	

**Nota:** Nº iso.<sup>1</sup> = número do isolado; Cód. iso.<sup>2</sup> = Código do isolado; Mun./Com.<sup>3</sup>: município e comunidade; ALF.<sup>4</sup> - *Latuca sativa* L.; N<sup>5</sup> – número da propriedade; N<sup>6</sup> - número da amostra coletada; ; STM.<sup>7</sup> – Santarém; Tb.<sup>8</sup> - Tabocal; S.R.<sup>9</sup> - Santa Rosa; E.N.<sup>10</sup>- Estrada Nova; M.C.<sup>11</sup> - Mojuí dos Campos; M.P.<sup>12</sup> - Mojuí dos Pereiras; CEB.<sup>13</sup> - *Allium schoenoprasum*; A.V.<sup>14</sup> - Área Verde; N<sup>15</sup> – colônia com morfologia diferente; CHI.<sup>16</sup> - *Eryngium foetidum* L.; COU.<sup>17</sup> - *Brassica oleracea* L.; BEL.<sup>18</sup> – Belterra; E.5<sup>19</sup> - Estrada cinco; V.R.<sup>20</sup> - Vitória Régia.; PEP.<sup>21</sup> - *Cucumis sativus* L.; PIM.<sup>22</sup> - *Capsicum annum* L.; TRA.<sup>23</sup>- Tracoá; SAL.<sup>24</sup> - *Petroselinum crispum* L.; TOM.<sup>25</sup> - *Solanum Lycopersicum* L.; I.V.<sup>26</sup> - Igarapé Vermelho; \* - Isolados em que foi realizada análise molecular. **Fonte:** CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

**Quadro 2** - Identificação de isolados, hospedeiros e locais de amostragens das hortaliças com sintomas de podridão mole

(continua)

23	CEB 3.10-2	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – A.V.	2°26'59.6"S; 54°41'16.1"W
24	CEB 3.10-3	<i>A. schoenoprasum</i> L.	STM. – A.V.	
25*	CHI <sup>16</sup> 1.1	<i>Eryngium foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	2°38'12.9" S; 54°43'03.1" W
26*	CHI 1.4	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
27*	CHI 1.5	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
28*	CHI 1.9	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
29*	CHI 1.10	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
30*	CHI 1.11	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
31	CHI 1.12	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
32*	CHI 1.13	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
33	CHI 1.14	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
34*	CHI 1.15	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
35	CHI 1.16	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
36*	CHI 1.17	<i>E. foetidum</i> L.	M.C. – M.P.	
37	COU <sup>17</sup> 1.1	<i>Brassica oleracea</i> L	STM. – S.R.	2°38'15.0" S; 54°43'56,7" W
38*	COU 2.1	<i>B. oleracea</i> L.	BEL. <sup>18</sup> – E5 <sup>19</sup>	2°39'17.6" S; 54°53'54.1" W
39*	COU 2.3	<i>Brassica oleracea</i> L.	BEL. – E5	
40*	COU 2.5	<i>B. oleracea</i> L.	BEL. – E5	
41*	COU 2.7	<i>B. oleracea</i> L.	BEL. – E5	
42*	COU 2.8	<i>B. oleracea</i> L.	BEL. – E5	
43*	COU 4.2	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – V.R. <sup>20</sup>	2°28'37.9" S; 54°43'10.5" W
44*	COU 4.4	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – V.R.	
45*	COU 4.8	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – V.R.	
46*	COU 4.9	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – V.R.	
47	COU 4.11	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – V.R.	
48*	COU 5.1	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – E.N.	2°33'26.6" S 54°40'04.0" W
49*	COU 5.2	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – E.N.	2°33'26.6" S 54°40'04.0" W
50	COU 5.3	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – E.N.	
51	COU 5.4	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – E.N.	
52	COU 5.7	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – E.N.	
53*	COU 5.8	<i>B. oleracea</i> L.	STM. – E.N.	
54*	COU 6.1	<i>B. oleracea</i> L.	M.C. – M.P.	2°38'12.9" S; 54°43'03.1" W
55*	PEP <sup>21</sup> 1.1	<i>Cucumis sativus</i> L.	M.C. – M.P.	2°38'12.9" S; 54°43'03.1" W
56	PEP 1.2	<i>C. sativus</i> L.	M.C. – M.P.	
57	PIM <sup>22</sup> 1.1	<i>Capsicum annum</i> L.	BEL. – TRA. <sup>23</sup>	2°39'41.5" S ;54°50'15.9" W
58	PIM 1.2	<i>C. annum</i> L.	BEL. – TRA.	
59	PIM 1.4	<i>C. annum</i> L.	BEL. – TRA.	
60	PIM 1.5	<i>C. annum</i> L.	BEL. - TRA.	
61	PIM 2.1	<i>C. annum</i> L.	BEL. - TRA.	

**Nota:** N° iso.<sup>1</sup> = número do isolado; Cód. iso.<sup>2</sup> = Código do isolado; Mun./Com.<sup>3</sup>: município e comunidade; ALF.<sup>4</sup> - *Latuca sativa* L.; N<sup>5</sup> - número da propriedade; N<sup>6</sup> - número da amostra coletada; ; STM.<sup>7</sup> - Santarém; Tb.<sup>8</sup> - Tabocal; S.R.<sup>9</sup> - Santa Rosa; E.N.<sup>10</sup> - Estrada Nova; M.C.<sup>11</sup> - Mojuí dos Campos; M.P.<sup>12</sup> - Mojuí dos Pereiras; CEB.<sup>13</sup> - *Allium schoenoprasum*; A.V.<sup>14</sup> - Área Verde; N<sup>15</sup> - colônia com morfologia diferente; CHI.<sup>16</sup> - *Eryngium foetidum* L.; COU.<sup>17</sup> - *Brassica oleracea* L.; BEL.<sup>18</sup> - Belterra; E.5<sup>19</sup> - Estrada cinco; V.R.<sup>20</sup> - Vitória Régia.; PEP.<sup>21</sup> - *Cucumis sativus* L.; PIM.<sup>22</sup> - *Capsicum annum* L.; TRA.<sup>23</sup> - Tracoá; SAL.<sup>24</sup> - *Petroselinum crispum* L.; TOM.<sup>25</sup> - *Solanum Lycopersicum* L.; I.V.<sup>26</sup> - Igarapé Vermelho; \* - Isolados em que foi realizada análise molecular. **Fonte:** CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

**Quadro 2** - Identificação de isolados, hospedeiros e locais de amostragens das hortaliças com sintomas de podridão mole

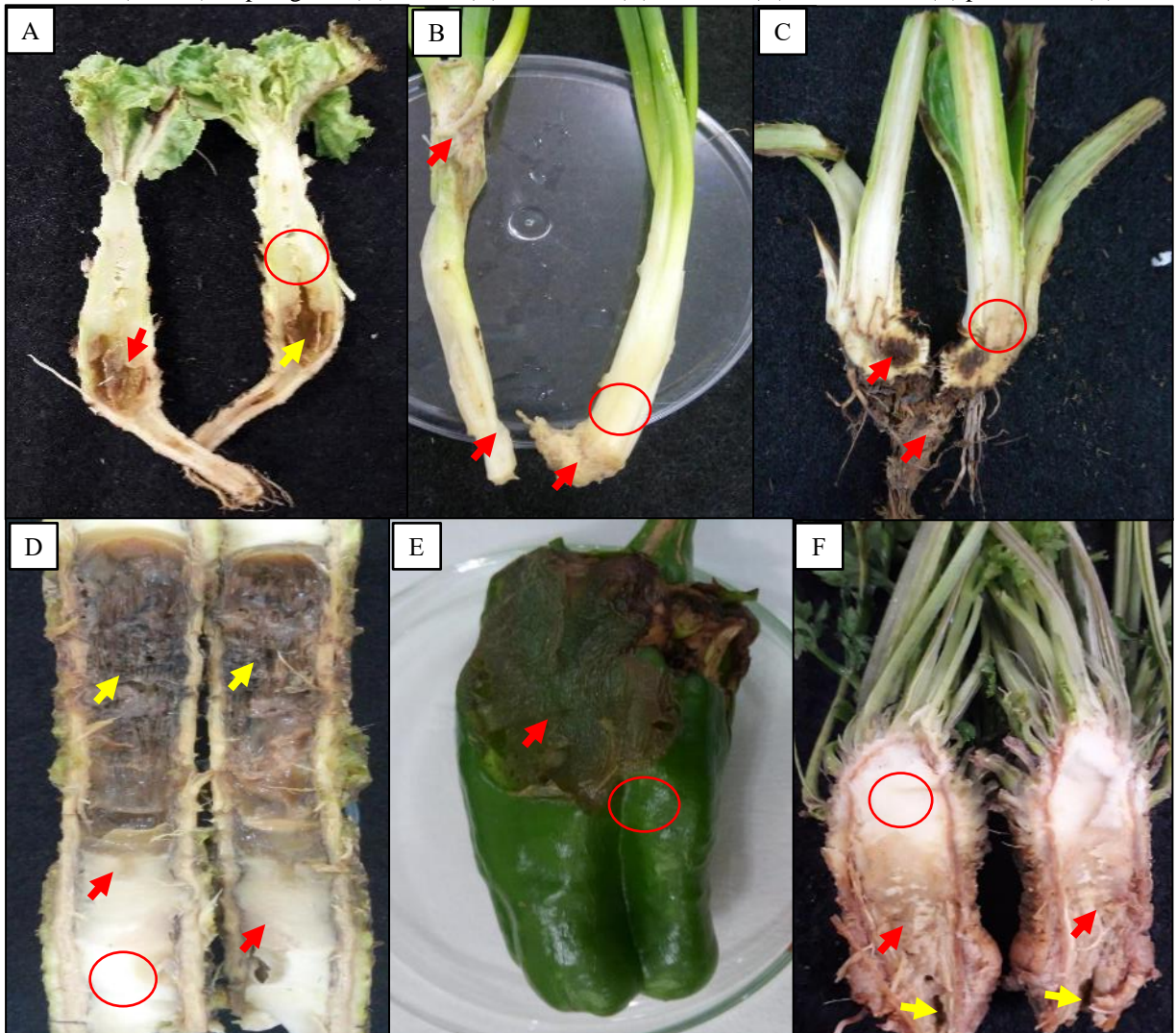
(conclusão)

62	PIM 2.3	<i>C. annum</i> L.	BEL. - E5	2°39'17.6"S; 54°53'54.1"W
63	PIM 2.4	<i>C. annum</i> L.	BEL. - E5	
64	PIM 2.5	<i>C. annum</i> L.	BEL. - E5	
65	PIM 2.6	<i>C. annum</i> L.	BEL. - E5	
66	PIM 2.7	<i>C. annum</i> L.	BEL. - E5	
67	PIM 2.7-1	<i>C. annum</i> L.	BEL. - E5	
68	PIM 2.11	<i>C. annum</i> L.	BEL. - E5	
69	PIM 2.12	<i>C. annum</i> L.	BEL. - E5	
70*	PIM 2.17	<i>C. annum</i> L.	BEL. - E5	
71	PIM 3.10	<i>C. annum</i> L.	M.C. – M.P.	
72	PIM 4.11	<i>C. annum</i> L.	M.C. – M.P.	2°38'12.9"S; 54°43'03.2"W
73*	SAL <sup>24</sup> 1.3	<i>Petroselinum crispum</i> L.	M.C. – M.P.	2°38'12.9"S; 54°43'03.1"W
74*	TOM <sup>25</sup> 1.1	<i>Solanum Lycopersicum</i> L.	STM – I.V. <sup>26</sup>	2°35'07.8"S; 54°37'38.4"W
75*	TOM 1.2	<i>S. Lycopersicum</i> L.	STM – I.V.	

**Nota:** N° iso.<sup>1</sup> = número do isolado; Cód. iso.<sup>2</sup> = Código do isolado; Mun./Com.<sup>3</sup>: município e comunidade; ALF.<sup>4</sup> - *Latuca sativa* L.; N<sup>5</sup> – número da propriedade; N<sup>6</sup> - número da amostra coletada; ; STM.<sup>7</sup> – Santarém; Tb.<sup>8</sup> - Tabocal; S.R.<sup>9</sup> - Santa Rosa; E.N.<sup>10</sup>- Estrada Nova; M.C.<sup>11</sup> - Mojuí dos Campos; M.P.<sup>12</sup> - Mojuí dos Pereiras; CEB.<sup>13</sup> - *Allium schoenoprasum*; A.V.<sup>14</sup> - Área Verde; N<sup>15</sup> – colônia com morfologia diferente; CHI.<sup>16</sup> - *Eryngium foetidum* L.; COU.<sup>17</sup> - *Brassica oleracea* L.; BEL.<sup>18</sup> – Belterra; E.5<sup>19</sup> - Estrada cinco; V.R.<sup>20</sup> - Vitória Régia.; PEP.<sup>21</sup> - *Cucumis sativus* L.; PIM.<sup>22</sup> - *Capsicum annum* L.; TRA.<sup>23</sup>- Tracoá; SAL.<sup>24</sup> - *Petroselinum crispum* L.; TOM.<sup>25</sup> - *Solanum Lycopersicum* L.; I.V.<sup>26</sup> - Igarapé Vermelho; \* - Isolados em que foi realizada análise molecular. **Fonte:** CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

Foram realizadas amostragens de plantas sintomáticas nos canteiros das hortas, com base nas descrições de Amorim et al. (2018) de todas as espécies de hortaliças estudadas. Estas plantas apresentavam clorose e murcha foliar, podridão da medula na região do colo das plantas (Setas vermelhas) e talo oco (Setas amarelas) como mostra a Figura 2.

**FIGURA 2** – Amostras com sintomas de podridão mole (setas vermelhas), talo oco (Setas amarelas) e áreas de isolamento (círculo) do patógeno: (A) alface, (B) cebolinha, (C) chicória, (D) couve-folha, (E) pimentão e (F) salsa



Fonte: CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

### 1.3.2 Isolamentos, purificações e conservação de isolados

Os isolamentos foram realizados segundo o método semi-seletivo em fruto de pimentão (Takatsu et al., 1981). Em resumo, pimentões saudáveis foram lavados em água corrente e submersos em solução à 5 % com hipoclorito de sódio por 5 minutos, posteriormente, foi realizada a pulverização de álcool 70 % nos frutos que foram deixados para secar naturalmente em bandejas previamente limpas e desinfestadas. As amostras com sintomas da podridão mole foram lavadas utilizando água corrente e desinfestadas em álcool a 70%, e quando necessário, foram cortadas utilizando uma faca previamente esterilizada em fogo. Utilizando palitos de madeira esterilizados, foi realizada um toque na região entre o tecido sintomático e o assintomático (círculo indicado na Figura 2), e posteriormente, o palito com inóculo foi fincado

nos pimentões sadios, que a partir desse momento foram incubados em câmara úmida por 24 a 48 h, a 29 °C.

Após a formação da lesão, na região de transição entre o tecido sadio e sintomático foi realizado um corte com agulha histológica esterilizada em chama, e utilizando a alça de platina estéril retirou-se o inóculo presente no pimentão e o transferiu, pela técnica de repicagem por estrias, para o meio sólido diferenciador composto por 1 g de caseína, 10 g de peptona, 10 g de glicose (CPG), 20 g de ágar bacteriológico e água destilada esterilizada (ADE) até completar 1 L. O meio foi autoclavado por 15 min à 180 °C, e depois distribuído em placas de petri de vidro com 10 cm de diâmetro (DE BOER & KELMAN, 2001).

Após incubação das placas por 48 horas, à 28 - 30 °C e fotoperíodo de 12 horas, as unidades formadoras de colônia (UFC) bacteriana eram identificadas e repicadas novamente no meio de cultura CPG. Esta etapa foi repetida 4 vezes até a formação de culturas axênicas, que foram conservadas em tubos de criogenia de 2 ml, transferindo-se as colônias das culturas para 1,8 ml de ADE (SOUZA et al., 2016).

### 1.3.3 Caracterização cultural das colônias dos isolados

As características culturais foram determinadas após consulta às descrições de caracterização culturais em meio de cultura sólido dos seguintes autores: Bergey's (2001, p.587), Prescott et al. (2002, p. 109), Duarte e El-Tassa (2003), Costa Júnior et al. (2009, p. 3), Anjos (2012, p.8) e Malajovich (2015). Neste sentido foi realizada a caracterização cultural quanto: forma, elevação, bordos, estrutura, aspecto de vidro quebrado, brilho, cor e consistência.

Todas as características foram tabuladas no programa Excel<sup>®</sup> e submetidas ao programa PAST<sup>®</sup> (Paleontological Statistics Software Package) versão 4.3 para realização da análise de agrupamento da distância Euclidiana média pelo Método de Grupos de Pares Não Ponderados com Média Aritmética (UPGMA) adotando-se o coeficiente de similaridade de 100%.

## 1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento de bactérias causadoras de podridão mole em meio de cultura CPG permitiu a identificação preliminar das características culturais de 75 isolados. As hospedeiras alface, cebolinha, chicória do pará, couve-folha e pimentão tiveram isolados culturalmente diferentes, enquanto os isolados de pepino e tomate foram semelhantes (Quadro 3).

**Quadro 3** - Conjunto de características culturais das isolados em meio de cultura CPG após 48 h de incubação à  $29 \pm 2$  °C e 12 h de luz

(Continua)

Nº	Isolado	For. <sup>1</sup>	Ele. <sup>2</sup>	Bor. <sup>3</sup>	Estr. <sup>4</sup>	A.V.Q. <sup>5</sup>	Bri. <sup>6</sup>	Cor	Cons. <sup>7</sup>
1	ALF <sup>8</sup> 1 <sup>9</sup> .1 <sup>10</sup>	Cir. <sup>11</sup>	Prot. <sup>12</sup>	Irs. <sup>13</sup>	Rug. <sup>14</sup>	S. <sup>15</sup>	Tlc. <sup>16</sup>	Cre. <sup>17</sup>	Úmi. <sup>18</sup>
2	ALF 1.2 <sup>m</sup>	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
3	ALF 1.3	Cir.	Conv. <sup>19</sup>	Irs.	Lisa	N. <sup>20</sup>	Tlc.	Cre.	Úmi.
4	ALF 1.4 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
5	ALF 2.1 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
6	ALF 3.1	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Inc. <sup>21</sup>	Úmi.
7	ALF 3.2 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tpr.	Inc.	Úmi.
8	ALF 4.1 <sup>m</sup>	Cir.	Ach. <sup>22</sup>	Irs.	Rug.	S.	Trp.	Inc.	Úmi.
9	ALF 4.3 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Acl. <sup>23</sup>	Úmi.
10	ALF 4.4 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
11	ALF 4.5	Irr. <sup>24</sup>	Conv.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
12	CEB <sup>25</sup> 1.1	Irr.	Conv.	Lis. <sup>26</sup>	Lisa	N.	Tpr. <sup>27</sup>	Inc.	Vis. <sup>28</sup>
13	CEB 2.1	Irr.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
14	CEB 2.2	Irr.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	CAM. <sup>29</sup>	Úmi.
15	CEB 2.3	Irr.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
16	CEB 3.4 <sup>m</sup>	Cir.	Prot.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
17	CEB 3.6 <sup>m</sup>	Irr.	Prot.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
18	CEB 3.6-2 <sup>30</sup>	Irr.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
19	CEB 3.9 <sup>m</sup>	Irr.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
20	CEB 3.9-2	Irr.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Vis.
21	CEB 3.10 <sup>m</sup>	Irr.	Prot.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
22	CEB 3.10-1	Cir.	Conv.	Irs.	Gra. <sup>31</sup>	S.	Opa. <sup>32</sup>	Cre.	Úmi.
23	CEB 3.10-2	Irr.	Prot.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
24	CEB 3.10-3	Irr.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.

**Nota:** <sup>m</sup> = isolado submetido a análises moleculares; <sup>1</sup>For. = forma; <sup>2</sup>Ele. = elevação; <sup>3</sup>Bor. = bordos; <sup>4</sup>Est. = estrutura; <sup>5</sup>A.V.Q. = aspecto de vidro quebrado; <sup>6</sup>Bri. = brilho; <sup>7</sup>Cons. = consistência; <sup>8</sup>ALF= Alface; <sup>9</sup>Número= ordem de coleta das propriedades; <sup>2</sup> Número= ordem de coleta das amostras; <sup>11</sup> Cir. = circular; <sup>12</sup> Prot. = protuberante; <sup>13</sup>Irs. = irregulares; <sup>14</sup> Rug. = rugosa; <sup>15</sup>S. = com aspecto envidraçado; <sup>16</sup>Tlc. = translúcida; <sup>17</sup>Cre. = creme; <sup>18</sup>Úmi. = úmida; <sup>19</sup>Conv. = convexa; <sup>20</sup> N.= sem aspecto envidraçado; <sup>21</sup>Inc. = incolor; <sup>22</sup>Ach. = achatada; <sup>23</sup>Acl. = amarela clara; <sup>24</sup>Irr. = irregular; <sup>25</sup>CEB = Cebolinha; <sup>26</sup>Lis. = lisos; <sup>27</sup>Tpr. = transparente; <sup>28</sup>Vis. = viscosa; <sup>29</sup>CAM. = creme amarelada; <sup>30</sup> Número = colônia com característica cultural diferente na mesma amostra; <sup>31</sup> Gra. = granulosa; <sup>32</sup>Opa. = opaca; <sup>33</sup>CHI = Chicória; <sup>34</sup>Elev. = elevados; <sup>35</sup>Bra. = branca; <sup>36</sup>Gel. = gelatinosa; <sup>37</sup>COU = Couve; <sup>38</sup>PEP = Pepino; <sup>39</sup>PIM= Pimentão; <sup>40</sup>SAL = Salsa; <sup>41</sup>TOM = Tomate. **Fonte:** CASTRO & SEVERO (2020).

**Quadro 3** - Conjunto de características culturais das isolados em meio de cultura CPG após 48 h de incubação à  $29 \pm 2^\circ \text{C}$  e 12 h de luz

(Continua)

Nº	Isolado	For. 1	Ele. 2	Bor. 3	Estr. 4	A.V.Q. 5	Bri. 6	Cor	Cons.7
25	CHI <sup>33</sup> 1.1 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	CAM.	Úmi.
26	CHI 1.4 <sup>m</sup>	Irr.	Ach.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
27	CHI 1.5 <sup>m</sup>	Irr.	Ach.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
28	CHI 1.9 <sup>m</sup>	Irr.	Conv.	Irs.	Gra.	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
29	CHI 1.10 <sup>m</sup>	Irr.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
30	CHI 1.11 <sup>m</sup>	Cir.	Elev. <sup>34</sup>	Lis.	Gra.	N.	Tlc.	Bra. <sup>35</sup>	Gel. <sup>36</sup>
31	CHI 1.12	Irr.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	CAM.	Úmi.
32	CHI 1.13 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Gra.	N.	Opa.	CAM.	Gel.
33	CHI 1.14	Cir.	Conv.	Irs.	Gra.	N.	Opa.	Cre.	Úmi.
34	CHI 1.15 <sup>m</sup>	Irr.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
35	CHI 1.16	Irr.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tpr.	Inc.	Úmi.
36	CHI 1.17 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	CAM.	Úmi.
37	COU <sup>37</sup> 1.1	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
38	COU 2.1	Cir.	Conv.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Bra.	Úmi.
39	COU 2.3 <sup>m</sup>	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
40	COU 2.5 <sup>m</sup>	Irr.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tpr.	Inc.	Úmi.
41	COU 2.7 <sup>m</sup>	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
42	COU 2.8 <sup>m</sup>	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
43	COU 4.2 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
44	COU 4.4 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
45	COU 4.8 <sup>m</sup>	Cir.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
46	COU 4.9 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
47	COU 4.11	Cir.	Prot.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
48	COU 5.1 <sup>m</sup>	Cir.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
49	COU 5.2 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
50	COU 5.3	Cir.	Prot.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	CAM.	Gel.
51	COU 5.5	Cir.	Conv.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
52	COU 5.7	Irr.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
53	COU 5.8 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	Cre.	Úmi.
54	COU 6.1 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tpr.	Inc.	Úmi.
55	PEP <sup>38</sup> 1.1 <sup>m</sup>	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Gel.

**Nota:** <sup>m</sup> = isolado submetido a análises moleculares; <sup>1</sup>For. = forma; <sup>2</sup>Ele. = elevação; <sup>3</sup>Bor. = bordos; <sup>4</sup>Est. = estrutura; <sup>5</sup>A.V.Q. = aspecto de vidro quebrado; <sup>6</sup>Bri. = brilho; <sup>7</sup>Cons. = consistência; <sup>8</sup>ALF= Alfaca; <sup>9</sup>Número= ordem de coleta das propriedades; <sup>2</sup>Número= ordem de coleta das amostras; <sup>11</sup> Cir. = circular; <sup>12</sup> Prot. = protuberante; <sup>13</sup>Irs. = irregulares; <sup>14</sup> Rug. = rugosa; <sup>15</sup>S. = com aspecto envidraçado; <sup>16</sup>Tlc. = translúcida; <sup>17</sup>Cre. = creme; <sup>18</sup>Úmi. = úmida; <sup>19</sup>Conv. = convexa; <sup>20</sup> N.= sem aspecto envidraçado; <sup>21</sup>Inc. = incolor; <sup>22</sup>Ach. = achatada; <sup>23</sup>Acl. = amarela clara; <sup>24</sup> Irr. = irregular; <sup>25</sup>CEB = Cebolinha; <sup>26</sup> Lis. = lisos; <sup>27</sup>Tpr. = transparente; <sup>28</sup>Vis. = viscosa; <sup>29</sup>CAM. = creme amarelada; <sup>30</sup>Número = colônia com característica cultural diferente na mesma amostra; <sup>31</sup> Gra. = granulosa; <sup>32</sup> Opa. = opaca; <sup>33</sup>CHI = Chicória; <sup>34</sup> Elev. = elevados; <sup>35</sup>Bra. = branca; <sup>36</sup> Gel. = gelatinosa; <sup>37</sup> COU = Couve; <sup>38</sup> PEP = Pepino; <sup>39</sup> PIM= Pimentão; <sup>40</sup> SAL = Salsa; <sup>41</sup>TOM = Tomate. **Fonte:** CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

**Quadro 3** - Conjunto de características culturais das isolados em meio de cultura Caseína, Peptona e Glicose após 48 h de incubação à  $29 \pm 2^\circ\text{C}$  e 12 h de luz

(Conclusão)

Nº	Isolado	For. 1	Ele. 2	Bor. 3	Estr. 4	A.V.Q. 5	Bri. 6	Cor	Cons.7
56	PEP 1.2	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Gel.
57	PIM39 1.1	Irr.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
58	PIM 1.2	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
59	PIM 1.4	Cir.	Conv.	Irs.	Lisa	N.	Tlc.	CAM.	Úmi.
60	PIM 1.5	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
61	PIM 2.1	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
62	PIM 2.3	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
63	PIM 2.4	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
64	PIM 2.5	Cir.	Prot.	Irs.	Gra.	S.	Tpr.	Inc.	Úmi.
65	PIM 2.6	Cir.	Conv.	Lis.	Gra.	S.	Tlc.	CAM.	Úmi.
66	PIM 2.7	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	CAM.	Úmi.
67	PIM 2.7-1	Irr.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
68	PIM 2.11	Cir.	Prot.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
69	PIM 2.12	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
70	PIM 2.17 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
71	PIM 3.10	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
72	PIM 4.11	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
73	SAL 40 1.3 <sup>m</sup>	Cir.	Conv.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
74	TOM <sup>41</sup> 1.1 <sup>m</sup>	Cir.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.
75	TOM 1.2 <sup>m</sup>	Cir.	Ach.	Irs.	Rug.	S.	Tlc.	Cre.	Úmi.

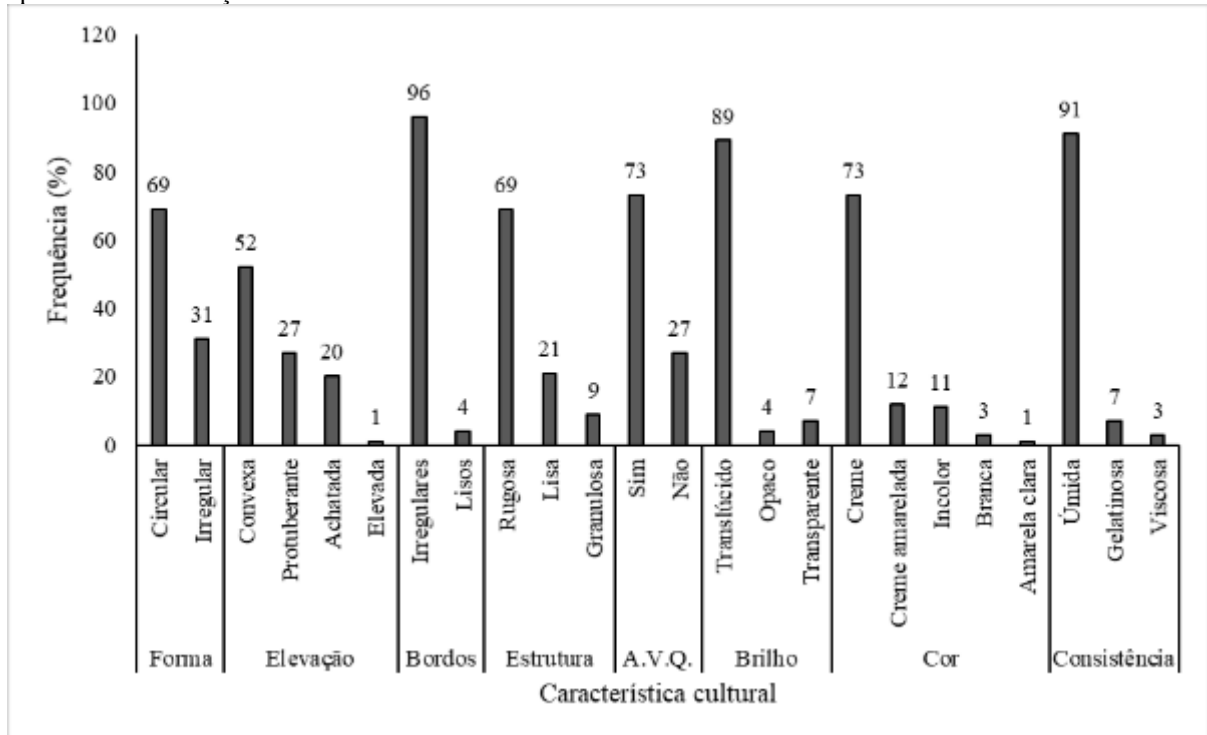
**Nota:** <sup>m</sup> = isolado submetido a análises moleculares; <sup>1</sup>For. = forma; <sup>2</sup>Ele. = elevação; <sup>3</sup>Bor. = bordos; <sup>4</sup>Est. = estrutura; <sup>5</sup>A.V.Q. = aspecto de vidro quebrado; <sup>6</sup>Bri. = brilho; <sup>7</sup>Cons. = consistência; <sup>8</sup>ALF= Alface; <sup>9</sup>Número= ordem de coleta das propriedades; <sup>2</sup>Número= ordem de coleta das amostras; <sup>11</sup> Cir. = circular; <sup>12</sup> Prot. = protuberante; <sup>13</sup>Irs. = irregulares; <sup>14</sup> Rug. = rugosa; <sup>15</sup>S. = com aspecto envidraçado; <sup>16</sup>Tlc. = translúcida; <sup>17</sup>Cre. = creme; <sup>18</sup>Úmi. = úmida; <sup>19</sup>Conv. = convexa; <sup>20</sup> N.= sem aspecto envidraçado; <sup>21</sup>Inc. = incolor; <sup>22</sup>Ach. = achatada; <sup>23</sup>Acl. = amarela clara; <sup>24</sup> Irr. = irregular; <sup>25</sup>CEB = Cebolinha; <sup>26</sup> Lis. = lisos; <sup>27</sup>Tpr. = transparente; <sup>28</sup>Vis. = viscosa; <sup>29</sup>CAM. = creme amarelada; <sup>30</sup> Número = colônia com característica cultural diferente na mesma amostra; <sup>31</sup> Gra. = granulosa; <sup>32</sup> Opa. = opaca; <sup>33</sup>CHI = Chicória; <sup>34</sup> Elev. = elevados; <sup>35</sup>Bra. = branca; <sup>36</sup> Gel. = gelatinosa; <sup>37</sup> COU = Couve; <sup>38</sup> PEP = Pepino; <sup>39</sup> PIM= Pimentão; <sup>40</sup> SAL = Salsa; <sup>41</sup>TOM = Tomate. **Fonte:** CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

Para a hospedeira chicória do Pará e salsa não foram encontrados relatos de bactérias causadoras de podridão mole, o que indica a carência de pesquisas para os dois hospedeiros relacionadas a bactérias causadoras de podridão mole, tanto na região norte, quanto em outras regiões do Brasil.

No meio de cultura CPG foram observadas 24 características culturais dentro das oito características principais elencadas (Figura 3). As características culturais predominantes foram forma circular (69 %), elevação convexa (52 %), bordos irregulares (96 %), estrutura rugosa (69 %), aspecto de vidro estilhaçado (73 %), brilho translúcido (89 %), cor creme (73 %) e aspecto úmido (91 %) (Figura 3). Na pesquisa de Tanny (2016), apesar de ter utilizado o meio

Nutriente Ágar (NA), características como forma, elevação, bordos, cor e brilho para bactérias do gênero *Pectobacterium* foram semelhantes aos dos isolados aqui apresentados.

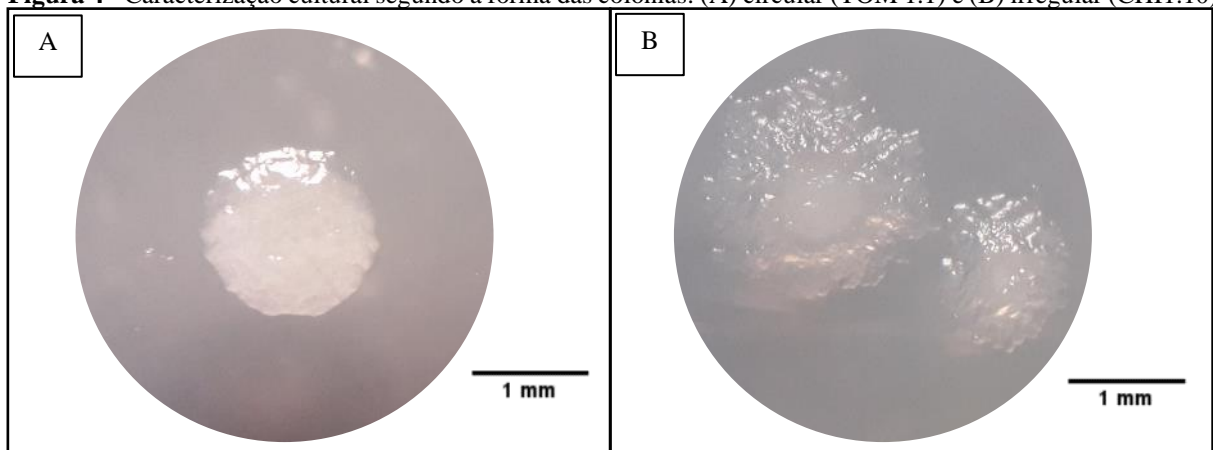
**Figura 3-** Frequência das características culturais de isolados em meio de cultura caseína-peptona-glicose (CPG) após 48 h de incubação à  $28 \pm 2$  °C e 12 h de luz



Fonte: CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

Foram identificadas duas formas, circular, onde as colônias eram redondas quando olhadas da perspectiva de cima da placa (Figura 4 A), e irregular que não apresentavam uma forma geométrica definida quando olhadas na mesma perspectiva (Figura 4 B).

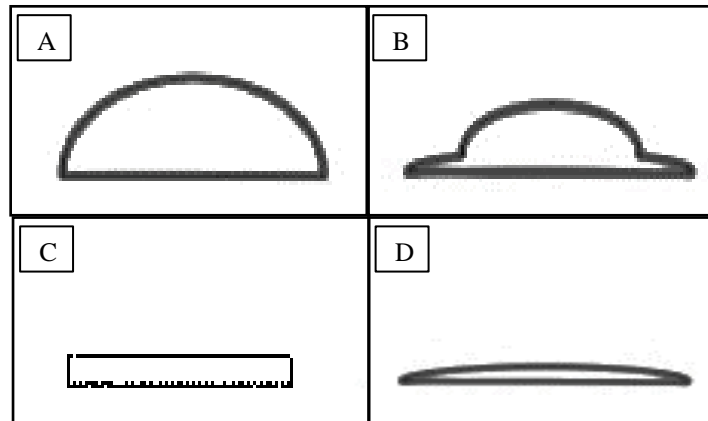
**Figura 4 -** Caracterização cultural segundo a forma das colônias: (A) circular (TOM 1.1) e (B) irregular (CHI1.10)



Fonte: CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

Quanto a elevação foram três convexas, cuja superfície é arredondada (Figura 5 A); protuberante, que tem as bordas achatadas, mas o centro elevado (Figura 5 B); a elevada, que tem a superfície plana (Figura 5 C), e a achatada, que é plana quase não sendo possível observar elevação (Figura 5 D).

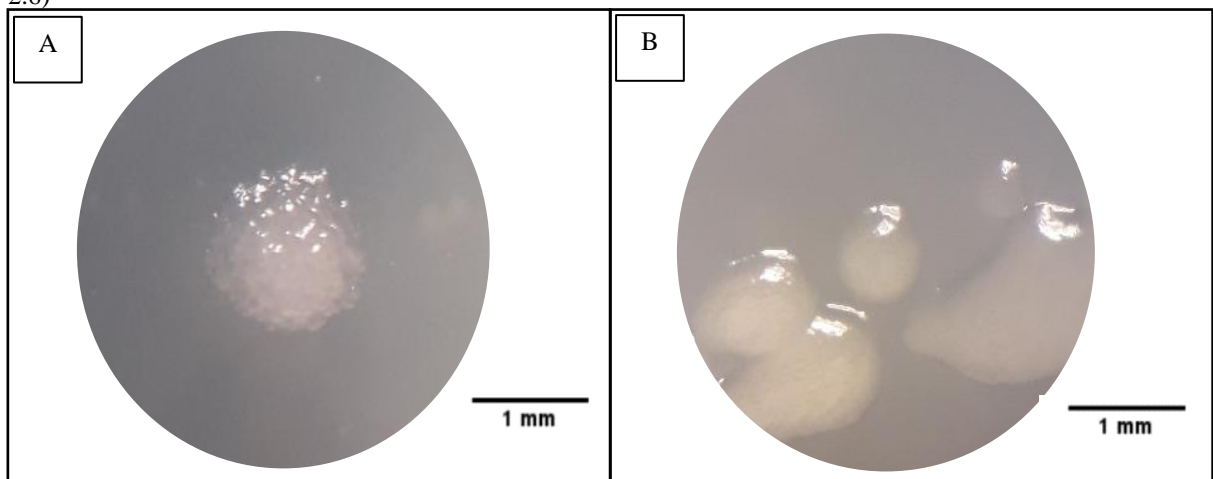
**Figura 5** - Caracterização cultural segundo a elevação das colônias: (A) convexa, (B) protuberante, (C) elevada e (D) achatada



Fonte: CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

Foram contabilizados dois tipos de bordos, os irregulares, que apresentavam irregularidades ou saliências nas bordas (Figura 6 A), e o liso, que eram contínuos sem saliências nas bordas (Figura 6 B).

**Figura 6** – Caracterização cultural segundo os bordos das colônias: (A) irregulares (PIM 4.11) e (B) lisos (PIM 2.6)

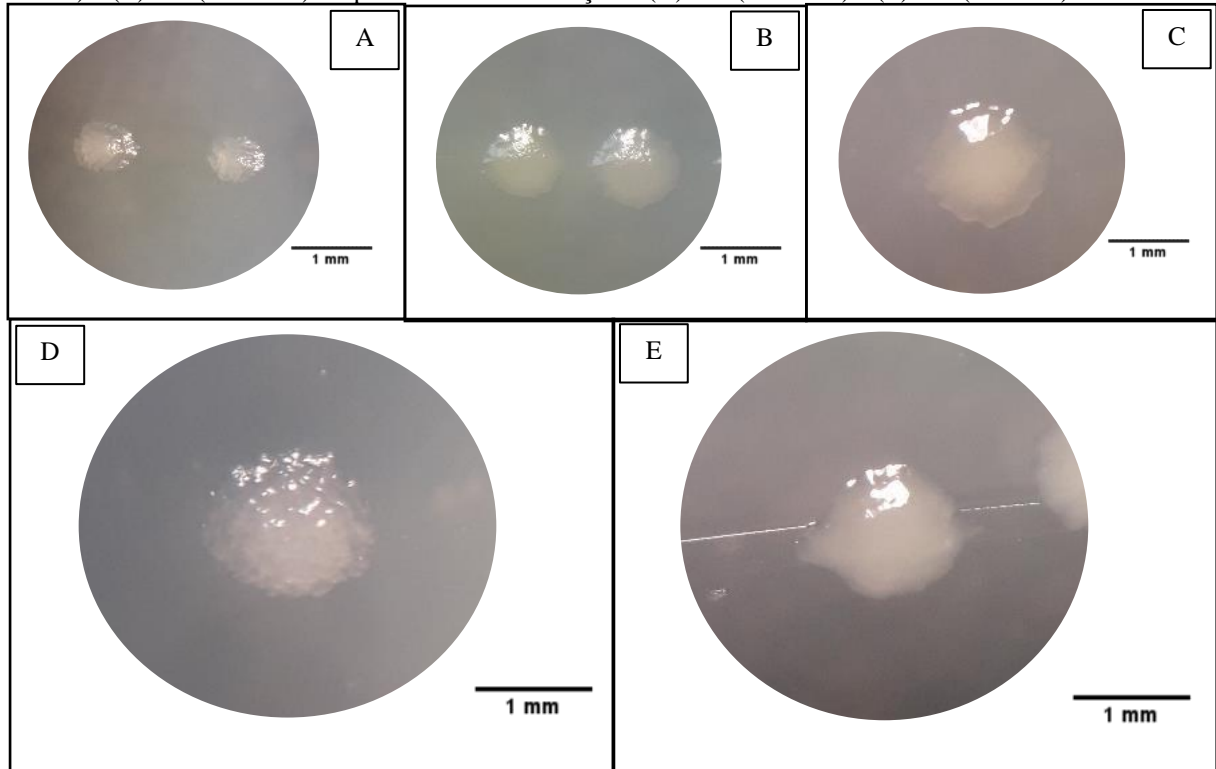


Fonte: CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

A estrutura foi classificada em rugosa, quando a superfície aparentou rugosidades (Figura 7 A), granulosa quando ao observá-la era possível identificar pontos em sua superfície (Figura 7 B), e lisa quando a superfície da colônia era ausente das características anteriores

(Figura 7 C). Contabilizando-se somente o aspecto de vidro estilhaçado, como na descrição de Alvarado et al., (2011), identificaram-se 54 isolados semelhantes à *Pectobacterium* (Figura 7 D), os isolados com estrutura lisa não tiveram aspecto de vidro quebrado (Figura 7 E).

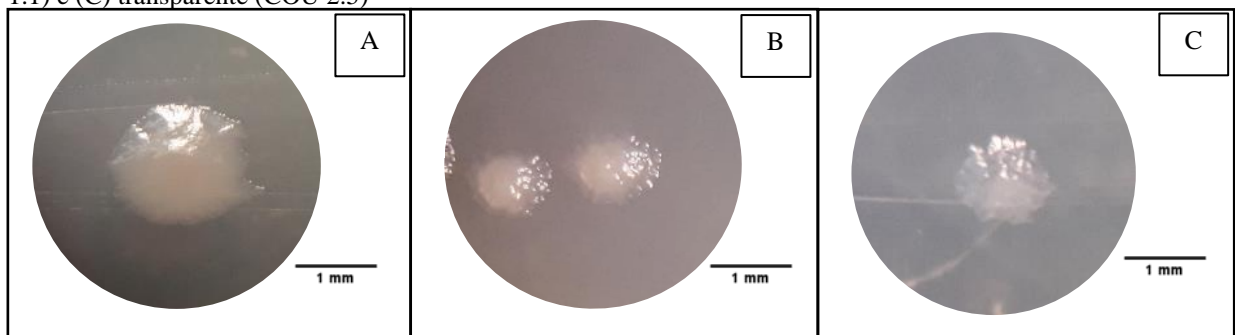
**Figura 7** – Caracterização cultural segundo a estrutura das colônias: (A) rugosa (COU 6.1), (B) granulosa (CEB 3.10-2) e (C) lisa (COU 5.3). Aspecto de vidro estilhaçado: (D) sim (COU 4.8) e (E) não (ALF 1.3)



**Fonte:** CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

Especificamente, quanto ao brilho, foram classificadas em opacas, quando não havia reflexão da luz (Figura 8 A), translúcidas quando ocorria reflexão da luz (Figura 8 B) e transparentes quando acontecia passagem de luz através das colônias (Figura 8 C).

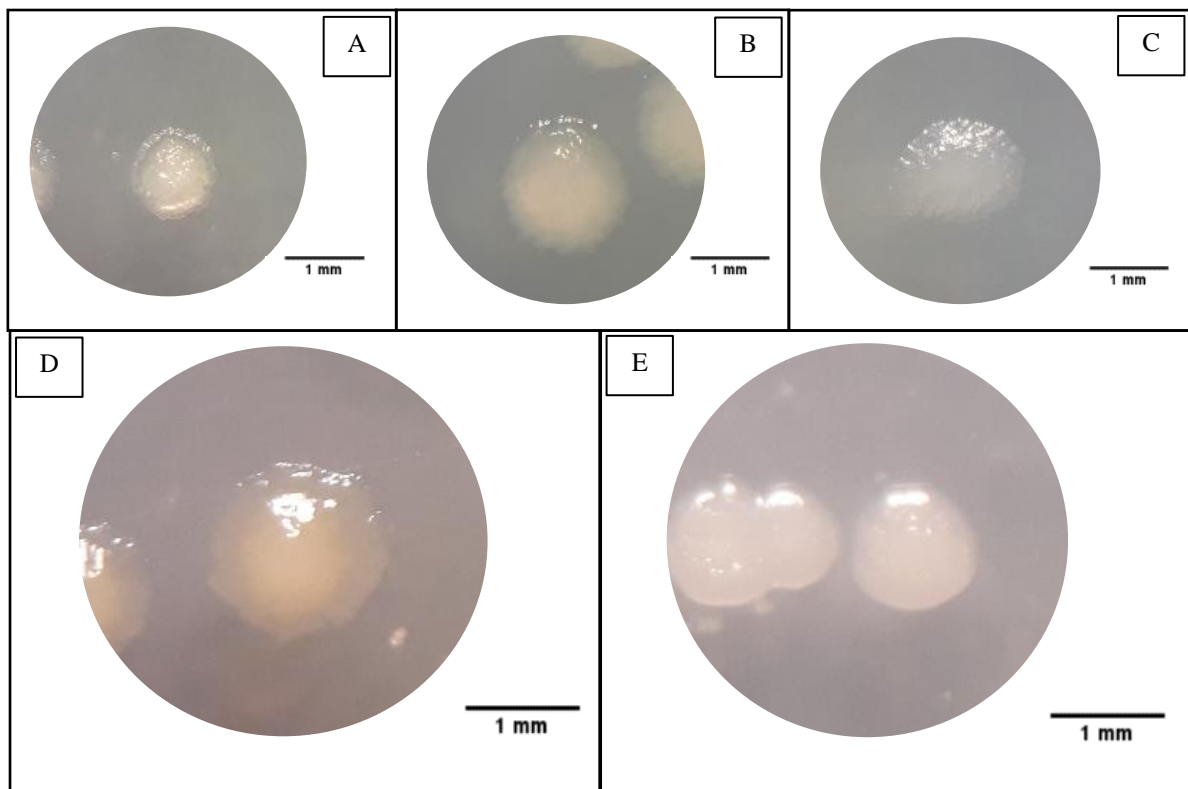
**Figura 8** – Caracterização cultural segundo o brilho das colônias: (A) opaca (CHI 1.14), (B) translúcida (COU 1.1) e (C) transparente (COU 2.5)



**Fonte:** CASTRO & SEVERO

Quanto as cores foram: creme (Figura 9 A), creme amarelado (Figura 9 B), Incolor (Figura 9 C), amarela clara (Figura 9 D) e branca (Figura 9 E). A cor creme que foi predominante, está presente nas descrições culturais de *Pectobacterium* para diferentes meios de cultura como o meio CHROMagar Orientation™ (SUHAIMI et al., 2017), Y.D.C. (Extrato de levedura, dextrose e Caseína) (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001), N.A. (Nutriente Ágar) (TANNY, 2016), Y.P.D.A. (Extrato de levedura, Peptona, Dextrose e Ágar) e Y.D.C.A. (Extrato de levedura, Dextrose, Cálcio e Ágar) (RAHMAN et al, 2010), essa cor foi identificada em 74% dos isolados coletados, o que caracteriza mais uma semelhança dos isolados ao gênero.

**Figura 9** – Caracterização cultural segundo a cor das colônias: (A) creme (ALF 1.2); (B) creme amarelado (PIM 2.7), (C) incolor (ALF 4.1), (D) amarela clara (ALF 4.3) e (E) Branca (CHI 1.11)



Fonte: CASTRO; SEVERO; GAMA (2021).

Se consideradas as características forma circular, bordos lisos e cor creme ou branca encontradas no isolado CHI 1.11 (Figura 9 E), estas assemelham-se também a isolados de *Burkholderia* spp. e *Ralstonia* spp. em meio CPG (JEONG et al., 2003; SARKAR & CHAUDHURI, 2015). Nenhuma colônia teve cor castanho escuro ou teve aparência de ovos fritos um indício da provável ausência de *B. glumae* (KARKI et al., 2012) e *Dickeya* spp. (ALIČ et al., 2017) respectivamente. No presente estudo, apenas uma colônia teve cor amarela (Figura

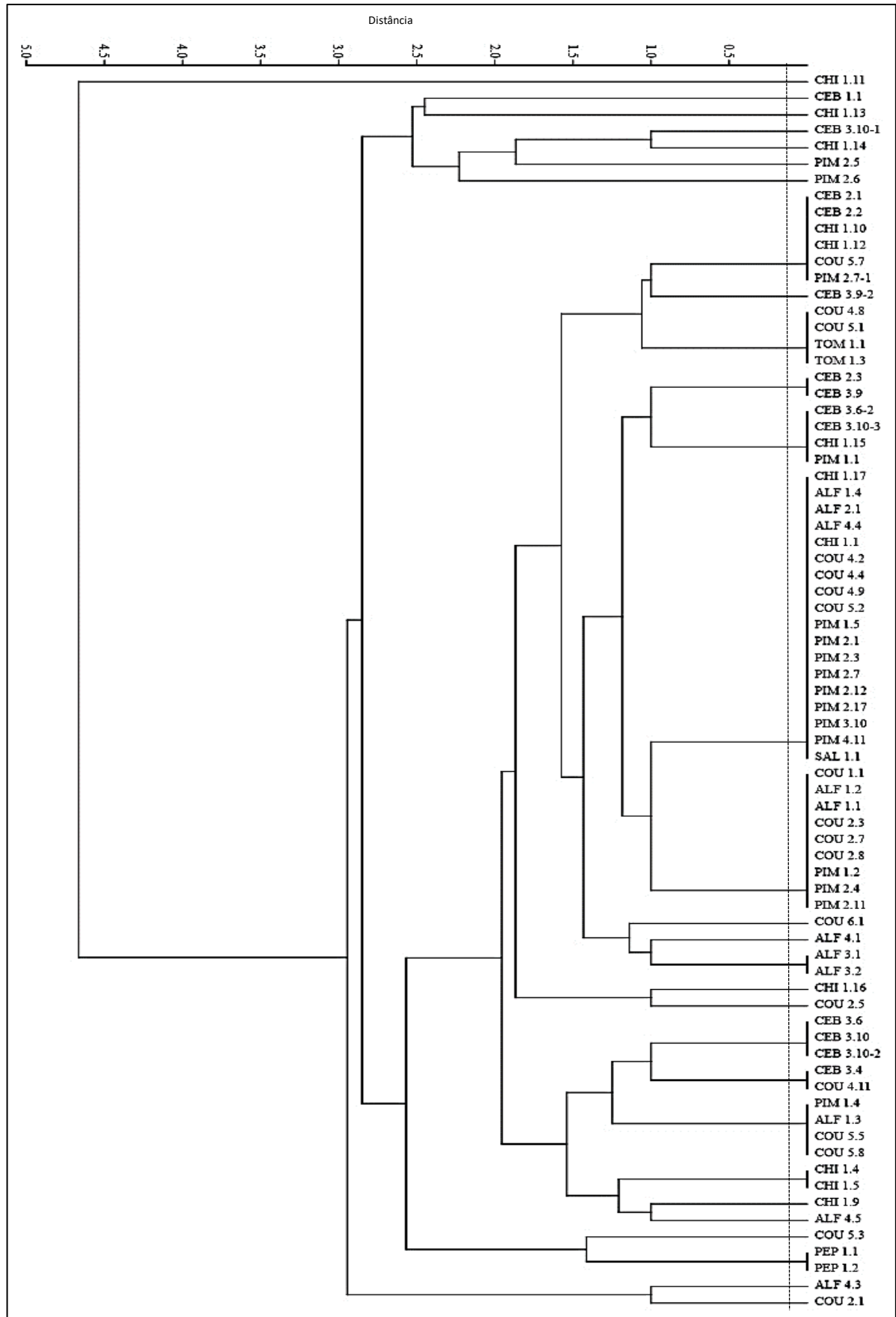
9 D), semelhante a *Pantoea agglomerans*, em meio de cultura CPG (MORALE-VALENZUELA et al., 2007; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

O dendograma utilizando a análise de UPGMA pelo método Euclidiano, considerando as características culturais das colônias, teve o coeficiente de correlação cofenética de 0,924, superior a 0,7 e próximo a 1, o que demonstra a confiabilidade do agrupamento gerado (BUSSAB; MIAZAKI; ANDRADE, 1990).

O dendograma diferenciou 29 culturas bacterianas ao nível de 100 % de semelhança (Figura 6). O maior grupo foi representado por isolados apresentando colônias com forma circular, elevação convexa, bordos irregulares, estrutura rugosa, com aspecto de vidro quebrado, brilho translúcido, cor creme e aspecto úmido.

Nos estudos de Moraes (2018) foram selecionadas colônias em meio de cultura CPG que tinham o aspecto de vidro quebrado, entretanto, em seus resultados o gênero *Pectobacterium*, apesar de predominante (64 %), não foi o único gênero encontrado.

**Figura 6** – Dendograma da distância euclidiana da morfologia cultural das isolados



Fonte: CASTRO; SEVERO; GAMA (2020)

## 1.5 CONCLUSÕES

A alta variabilidade das características culturais das isolados impossibilitou a identificação precisa de gêneros e espécies causadores da podridão mole na região Oeste do Pará. Porém, evidenciou que gêneros da ordem Enterobacterales estão envolvidos. Em função destes resultados, recomenda-se a realização de estudos posteriores utilizando-se técnicas de biologia molecular para a identificação precisa das espécies bacterianas associadas à podridão mole nessa região.

## 1.6 REFERÊNCIAS

ALIČ, Š. et al. Putative new species of the genus *Dickeya* as major soft rot pathogens in *Phalaenopsis* orchid production. **Plant Pathology**, v. 66, n. 8, p. 1357-1368, 2017. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12677> Acesso em: 1 set. 2019.

ALVARADO, I. C. M. et al. Characterization and variability of soft rot-causing bacteria in Chinese cabbage in north eastern Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, n.1, 173-181, 2011. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.866.6972&rep=rep1&type=pdf> Acesso em: 25 ago. 2021.

AMANAT, F. et al. Extracellular production of pectinase from bacteria isolated from rotten apples from Lahore, Pakistan. **BioScientific Review**, v. 1, n. 3, p. 37-45, 2019. Disponível em: <https://journals.umt.edu.pk/index.php/BSR/article/view/512/485> Acesso em: 30 jul. 2021.

ANJOS, T. V.; TEBALDI, N. D.; FAGIANI, C. C. Coleção e preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. **Horizonte Científico**, v.6, n.1, p. 1-24, 2012. Disponível em: [https://scholar.google.com/scholar\\_url?url=http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/view/11643&hl=pt-BR&sa=T&oi=gsb&ct=res&cd=0&d=9648218160446981811&ei=-38uYc\\_7MIWImwGI6GYAg&scisig=AAGBfm1A0ryi6JbjKCp14-IrCEDJtiFAQ](https://scholar.google.com/scholar_url?url=http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/view/11643&hl=pt-BR&sa=T&oi=gsb&ct=res&cd=0&d=9648218160446981811&ei=-38uYc_7MIWImwGI6GYAg&scisig=AAGBfm1A0ryi6JbjKCp14-IrCEDJtiFAQ) Acesso em: 31 ago. 2021.

BARROSO, K. A. et al. First report of *Pectobacterium aroidearum* causing soft rot in lettuce and Chinese cabbage in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3274, 2019. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-12-18-2237-PDN> Acesso em 12 jul. 2021.

BARROSO, K. A. et al. Resistência de variedades de alface à podridão mole causada por *Pectobacterium aroidearum*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 101914-101925, 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/22130/17677> Acesso em: 8 nov. 2021.

CARDOSO, S. V. D. **Identificação de bactérias causadoras de podridões moles de ocorrência nos estados do Pará e Minas Gerais**. 2019. 59f. Dissertação (Mestrado) Pós-

graduação em Agronomia/ Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras-MG. Disponível em: [http://177.105.2.222/bitstream/1/34168/2/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Identifica%C3%A7%C3%A3o%20de%20bact%C3%A9rias%20causadoras%20de%20podrid%C3%B5es%20moles%20de%20ocorr%C3%Aancia%20nos%20estados%20do%20Par%C3%A1%20e%20Minas%20Gerais.pdf](http://177.105.2.222/bitstream/1/34168/2/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Identifica%C3%A7%C3%A3o%20de%20bact%C3%A9rias%20causadoras%20de%20podrid%C3%B5es%20moles%20de%20ocorr%C3%Aancia%20nos%20estados%20do%20Par%C3%A1%20e%20Minas%20Gerais.pdf) Acesso em: 1 set. 2020

CHARKOWISKI, A. O. The changing face of bacterial soft-rot diseases. **Annual Review Phytopathology**, v. 56, p.269-288. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045906> Acesso em: 28 jun. 2020.

CIANCIOTTO, N. P.; WHITE, R.C. Expanding role of type II secretion in bacterial pathogenesis and beyond. **Infection and immunity**, v. 85, n. 5, p. 014-17, 2017. DOI <https://doi.org/10.1128/IAI.00014-17> Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/IAI.00014-17> Acesso em: 30 jul. 2021.

COSTA JÚNIOR, R. C. et al. Isolamento e caracterização morfológica de bactérias em nódulos de leguminosas forrageiras. **JORNADA DE ENSINO, PESQUISA e EXTENSÃO DA UFRPE**, v. 9, 2009. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepeX2009/cd/resumos/R1291-1.pdf> Acesso em: 01 ago. 2021.

DE BOER, S.H. & KELMAN, A. *Erwinia* soft rot group. In: Schaad N.W., Jones, J.B. & Chun, W. (Eds.) **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3th ed. St. Paul. American Phytopathological Society. 2001. pp.56-72.

DE MELLO, M. R. F. et al. Redução da podridão mole em couve-chinesa mediada por indutores de resistência. **CIENTEC-Revista de Ciência, Tecnologia e Humanidades do IFPE**, v. 9, n. 2, 2018.

DUARTE, V.; EL TASSA, S. O. M. Taxonomia do gênero *Pectobacterium*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 11, p. 1-41, 2003.

EL-TASSA, S. O. M.; DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 620-625, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fb/a/TYYGwsCVJ4W9vSxghdVvDVf/?format=html> Acesso em 12 jul. 2021.

FÉLIX, K. C.; SILVA, C. L.; OLIVEIRA, W. J.; MARIANO, R. L.; SOUZA, E. B. Calcium-mediated reduction of soft rot disease in Chinese cabbage. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, p.73-84, 2016.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/3032/303226520015.pdf> Acesso em: 14 dez. 2021.

HAFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. de L. Podridão mole em plantas de cebolinha causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Roraima, Brasil. **Acta Amazonica**, v.38, nº3, Manaus-AM. 2008.

HAY, I. D. et al. Structure and membrane topography of the vibrio-type secretin complex from the type 2 secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 200, n. 5, p. e00521-17, 2018.

HAYASHI, K. et al. Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFF 03-01173. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1359-1363, 1997. DOI [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00191-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00191-X) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003194229700191X> Acesso em: 29 jul. 2021.

HENZ G. P. et al. *Erwinia chrysanthemi*: bactéria pectolítica envolvida na “mela” da mandioquinha-salsa no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 10, p. 1567-1571, 2006. Disponível em: <<https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/7317>> Acesso em 09 jul. 2021.

HERRON, S. R. et al. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8762-8769, 2000. Disponível em: <http://europepmc.org/article/PMC/34009> Acesso em: 29 jul. 2021.

HU, N. et al. XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. **Biochemical Journal**, v. 365, n. 1, p. 205-211, 2002. DOI 10.1042/BJ20020194 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222646/> Acesso em: 29 jul. 2021.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005. DOI <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511305001765> Acesso em: 29 jul. 2021.

JEONG, Y. et al. Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. **Plant disease**, v. 87, n. 8, p. 890-895, 2003. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2003.87.8.890>> Acesso em 12 jul. 2021

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970. Disponível em: <[https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Articles/Phyto60n06\\_969.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Articles/Phyto60n06_969.pdf)> Acesso em 12 jul. 2021

KARKI, H. S.; BARPAGHA, I. K.; HAM, J. H. A conserved two-component regulatory system, PidS/PidR, globally regulates pigmentation and virulence-related phenotypes of *Burkholderia glumae*. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 7, p. 785-794, 2012. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1364-3703.2012.00787.x> Acesso em: 30 ago. 2021.

LEITE, S. dos S; SEVERO, R.; MELLO, K. K. de S. Ensinando olericultores a identificar e manejar agroecologicamente a antracnose foliar da cebolinha, Santarém-PA. **Cadernos de Agroecologia**, Anais do VI CLAA, X CBA e V SEMDF – Vol. 13, N° 1, Jul. 2018. ISSN:

2236-7934 Disponível em: <http://cadernos.aba-agroecologia.org.br/index.php/cadernos/article/view/806/523> Acesso em: 24 fev. 2021.

LOPES, C. A.; HENZ, G. P. Podridões-moles das hortaliças causadas por bactérias. **EMBRAPA-CNPB. Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças**, 1998. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/765903/1/cot8.pdf> Acesso em: 8 nov. 2021.

MACAGNAN, D. et al. Podridão-mole em pós-colheita de batata (*Solanum tuberosum*) incitada por *Pseudomonas viridiflava*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 307-308, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/WNVrMGZzTH9CTGZdS5StLyJ/?lang=pt&format=html> Acesso em: 29 jul. 2021.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. da S.; SCHURT, D. A. Podridão-mole do alho causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* no Estado de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p. 192-192, 2008.

MACEDO, M. P. et al. Caracterização macromorfológica de colônias bacterianas isoladas do manguezal. **Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq**, n. 19, 2017.

MELLO, K. K. de S.; SEVERO, R.; LEITE, S. dos S. Ensinando olericultores a identificar e manejar agroecologicamente a nematose de galha da chicória do Pará. **Cadernos de Agroecologia**, Anais do VI CLAA, X CBA e V SEMDF – Vol. 13, N° 1, Jul. 2018. ISSN: 2236-7934 Disponível em: <http://cadernos.aba-agroecologia.org.br/index.php/cadernos/article/view/807/521> Acesso em: 24 fev. 2021.

MENG, X. et al. Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. **Plant disease**, v. 101, n. 2, p. 279-287, 2017.

MOHAMMED, N. O.; ABDALLA, M. A. A.; RAHIM, A. M. A. Production and Characterization of Pectic Enzymes of *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*. **Gezira Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 15, n. 1, p. 32-45, 2021.

MORAES, A. J. G. et al. First report of *Pectobacterium aroidearum* causing soft rot of pepper (*Capsicum annuum*) fruits in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 3054, 2020. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-02-20-0403-PDN> Acesso em: 8 nov. 2021.

MORAES, A. J. G. et al. First report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing soft rot of *Cucurbita pepo* in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 2, p. 379, 2017. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-08-16-1168-PDN>> Acesso em 12 jul. 2021.

MORAES, A.J.G. **Diversidade de bactérias causadoras de podridão mole em hortaliças no estado de Pernambuco**. 2018. 109f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Curso de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2018.

MOUAYED, H.; WARDY, G. A.; SEDEEQ, A. S. Isolation and identification of *Pseudomonas putida* from soils of plant roots and determine the ability to produce hydrolases Enzymes. **Iraqi Journal of Science**, p. 228-233, 2019. ISSN 0067-2904 Disponível em: <https://ijs.uobaghdad.edu.iq/index.php/eijs/article/view/614> Acesso em: 29 jul. 2021.

NAVROSKI, D. et al. Diversidade morfológica de rizobactérias obtidas de solos sob distintos manejos de cultivo da região oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 1, p. 117-128, 2015. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Renan-Appel/publication/307680145\\_Diversidade\\_Morfologica\\_de\\_Rizobacterias\\_Obtidas\\_de\\_Solos\\_SoB\\_Distintos\\_Manijos\\_de\\_Cultivo\\_da\\_Regiao\\_Oeste\\_do\\_Parana/links/5c018b5345851523d1561e16/Diversidade-Morfologica-de-Rizobacterias-Obtidas-de-Solos-SoB-Distintos-Manijos-de-Cultivo-da-Regiao-Oeste-do-Parana.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Renan-Appel/publication/307680145_Diversidade_Morfologica_de_Rizobacterias_Obtidas_de_Solos_SoB_Distintos_Manijos_de_Cultivo_da_Regiao_Oeste_do_Parana/links/5c018b5345851523d1561e16/Diversidade-Morfologica-de-Rizobacterias-Obtidas-de-Solos-SoB-Distintos-Manijos-de-Cultivo-da-Regiao-Oeste-do-Parana.pdf) Acesso em: 14 dez. 2021.

NÓBREGA, F. G. da; BOSSOLAN, N. R. S. **Invisíveis, hóspedes e bem-vindos: os microrganismos**. In: *Ciências: ensino fundamental* [S.l: s.n.], 2010. Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4373043/mod\\_resource/content/1/introducao\\_microbiologia%203.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4373043/mod_resource/content/1/introducao_microbiologia%203.pdf) Acesso em: 08 nov. 2021

QUEIROZ, M. F. et al. First report of soft rot in kale caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 12, p. 2144-2144, 2017. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-02-17-0266-PDN> Acesso em: 30 ago. 2021.

RAHMAN, M. M. et al. Pathogenic Variability of Potato Soft Rot Bacteria in Bangladesh. **Bangladesh J. Agriculturist.**, v.3, n.2, p: 109–118, 2010. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Dr-Majibar-Rahman/publication/350544622\\_Pathogenic\\_Variability\\_of\\_Potato\\_Soft\\_Rot\\_Bacteria\\_in\\_Bangladesh/links/60656458299bf1252e1d0dfe/Pathogenic-Variability-of-Potato-Soft-Rot-Bacteria-in-Bangladesh.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Dr-Majibar-Rahman/publication/350544622_Pathogenic_Variability_of_Potato_Soft_Rot_Bacteria_in_Bangladesh/links/60656458299bf1252e1d0dfe/Pathogenic-Variability-of-Potato-Soft-Rot-Bacteria-in-Bangladesh.pdf) Acesso em: 9 nov. 2021.

REZENDE, J. S. Caracterização epidemiológica da podridão mole da couve-chinesa causada por *Pectobacterium aroidearum*. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal Rural de

ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. Universidade Federal de Viçosa. UFV-RS. Editora UFV. 2005. 2ª ed. p.417.

ROMEIRO, R. da S. Métodos em bacteriologia de plantas. **Viçosa: UFV**, v. 279, 2001.

ROMEIRO, R. S. et al. Bacterial sudden yellow death and soft rot of *Coriandrum sativum*. **Plant pathology**, v. 43, n. 5, p. 944-946, 1994. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3059.1994.tb01641.x> Acesso em 05 jul. 2021.

ROMEIRO, R. S. et al. Soft rot of Peruvian carrot due to *Erwinia carotovora* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 37, n. 2, p. 300-302, 1988. Disponível em: <

<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02079.x>>  
Acesso em: 09 de jul.2021.

SALMOND, G. P. C.; REEVES, P. J. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 7-12, 1993. DOI [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90080-7](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90080-7) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0968000493900807> Acesso em: 29 jul. 2021.

SARKAR, S.; CHAUDHURI, S. New report of additional enterobacterial species causing wilt in West Bengal, India. **Canadian journal of microbiology**, v. 61, n. 7, p. 477-486, 2015. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/full/10.1139/cjm-2015-0017#> Acesso em: 1 set. 2021.

SEVERO, R. SAGAMA, I. T.; Diagnose de plantas a doenças ocorrentes em hortas familiares comerciais de Santarém: integrando ensino-pesquisa-extensão (1ª edição, 2015) **Rev. Ext. Integrac. Amaz**, v.1, n.2, p. 32-35, 2019. ISSN: 2675-1097. Disponível em: <http://www.ufopa.edu.br/portaldeperiodicos/index.php/extensaodaintegracaoamazonica/article/view/1191/681> Acesso em: 24 fev. 2019.

SEVERO, R.; SHIBUTANI, L. J. S. Ensinando olericultores a identificar e manejar agroecologicamente a murcha bacteriana das solanáceas. **Cadernos de Agroecologia**, Anais do XI Congresso Brasileiro de Agroecologia, São Cristóvão, Sergipe -v. 15, no 2, 2020. ISSN 2236-7934. Disponível em: <http://cadernos.aba-agroecologia.org.br/index.php/cadernos/article/view/3255/3801> Acesso em: 24 fev. 2021.

SILVA, A. M. F. et al. Levantamento da intensidade da podridão mole em alface e couve-chinesa em pernambuco. *Revista Caatinga*, v. 20, n. 2, p. 84-93, 2007. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/2371/237117548014.pdf> acesso em: 8 nov. 2021.

SILVA, A. S. et al. Diversity of *Pectobacterium* strains by biochemical, physiological, and molecular characterization. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 36, n. 2, p. 316-323, Mar./Apr. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n2a2020-46256>> Acesso em 25 nov. 2020.

SILVA, C. L. et al. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão mole em alface crespa. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 632-638, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/BnCqnf4ybQxj6XtvYnSDmg/?lang=pt&format=pdf> Acesso em: 25 ago. 2021.

SKERMAN, 1980.

SOUSA, A. M. et al. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. **Journal of microbiological methods**, v. 95, n. 3, p. 327-335, 2013. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701213003035?casa\\_token=A4adZdYxUSkAAAAA:vBM3PE2fgcC884FUOVmwwRV70mOEqyBdOUkQjjhXenLi055MEnAHxxnoCIFnsBJlhEEggW5ZY-Dt](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701213003035?casa_token=A4adZdYxUSkAAAAA:vBM3PE2fgcC884FUOVmwwRV70mOEqyBdOUkQjjhXenLi055MEnAHxxnoCIFnsBJlhEEggW5ZY-Dt) Acesso em: 30 ago. 2021.

SUHAIMI, N. S. M. et al. Antagonistic effects of biofilm-forming bacterial strains co-inoculated with blood disease pathogenic strain, *Ralstonia syzygii* subspecies *celesbesensis* in banana plants. **European journal of plant pathology**, v. 148, n. 1, p. 13-26, 2017. Disponível

em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10658-016-1064-x.pdf> Acesso em: 1 set.2021.

TAKATSU, A.; MELLO, S.C.M.; GARCIA, E.S.D.B. Fruto de pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 550-551. 1978.

TOTH, I. K. et al. *Pectobacterium* and *Dickeya*: environment to disease development. In: **Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species**. Springer, Cham, 2021. p. 39-84. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-61459-1\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-61459-1_3)> Acesso em: 10 jul. 2021.

TOTH, I. K. et al. *Pectobacterium* and *Dickeya*: taxonomy and evolution. In: **Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species**. Springer, Cham, 2021. p. 13-37. DOI [https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1_2) Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-61459-1\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-61459-1_2) Acesso em: 30 jul. 2021.

VAN DER WOLF, J. M. et al. Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. **Plant Pathology**, v. 66, n. 4, p. 571-583, 2017. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12600> Acesso em: 8 nov. 2021.

VAN DER WOLF, J. M.; DE BOER, S. H. Bacterial pathogens of potato. In: *Potato biology and biotechnology*. Elsevier Science BV, 2007. p. 595-617. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444510181500695>> Acesso em 05 jul. 2021.

VERZIGNASSI, J. R. et al. Podridão mole (*Erwinia carotovora*) em couve no Pará. **EMBRAPA**, 2020. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/385281/1/PodridaoMole.pdf>> Acesso em 05 jul 2020

## **CAPÍTULO 2**

### **VARIABILIDADE PATOLÓGICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS BACTERIANOS CAUSADORES DE PODRIDÃO MOLE EM HORTALIÇAS NA REGIÃO OESTE DO PARÁ, BRASIL<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Nota científica segundo as normas da revista Ciência Rural (Anexo 1)

1 **Variabilidade patológica e diversidade genética de isolados bacterianos causadores de**  
2 **podridão mole em hortaliças na região oeste do Pará, Brasil**

3 **Pathological variability and genetic diversity of bacterial strains causing soft rot of**  
4 **horticultural species in west Pará region, Brazil**

5 **Henara Valéria Miranda Castro<sup>1</sup> Leandro Jun Soki Shibutani<sup>1</sup> Robinson Severo<sup>1</sup>**  
6 **Ana Dulce Botelho Baia<sup>2</sup> Elineide Barbosa de Souza<sup>3</sup> Marco Aurélio Siqueira da**  
7 **Gama<sup>2</sup>\***

8 **ABSTRACT**

9 Seventy-five pectinolytic isolates collected from vegetables grown in the counties of Santarém,  
10 Belterra and Mojuí dos Campos, western Pará, were studied according to their pathological and  
11 genetic variability. We discriminated the isolates according to pathogenicity in potato, pepper,  
12 carrot and onion, and thirty-eight isolates were selected according to pathological variability  
13 for genetic analysis of rep-PCR. The isolates were divided into 5 pathogenic groups and 35  
14 groups according to rep-PCR at 70 % similarity, which demonstrated the high pathological and  
15 genetic variability of the isolates in the region. The results found in this study can be used in  
16 etiological research and in the development and application of soft rot management techniques  
17 in this region.

18 **Key-words:** pectinolytic bacteria; pathogenicity; rep-PCR; host range.

---

<sup>1</sup>Institute of Biodiversity and Forests, Federal University of Western Pará (UFOPA), Santarém, Pará, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Plant Health, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brazil. E-mail: mas.gama@yahoo.com.br, \*Corresponding author.

<sup>3</sup>Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

## 1 RESUMO

2 Setenta e cinco isolados de bactérias pectinolíticas coletadas em hortaliças cultivadas nos  
3 municípios de Santarém, Belterra e Mojuí dos Campos, oeste do Pará, foram estudados quanto  
4 à variabilidade patológica e diversidade genética. De acordo com a patogenicidade em batata,  
5 pimenta, cenoura e cebola os isolados foram agrupados em cinco grupos diferentes. Trinta e  
6 oito isolados representando os cinco clusters foram selecionadas para análise molecular usando  
7 rep-PCR. Essas isolados foram divididas em 35 grupos de acordo com rep-PCR a 70 % de  
8 similaridade, o que demonstrou alta diversidade genética das isolados da região. Os resultados  
9 encontrados neste estudo serão utilizados em futuras pesquisas etiológicas e para o  
10 desenvolvimento e aplicação de medidas de controle integrado da podridão mole nesta região.

11 **Palavras-chave:** bactérias pectinolíticas; patogenicidade; rep-PCR; gama de hospedeiros.

12

13 A podridão mole causada por bactérias é uma doença global importante que ocorre em  
14 vários vegetais (MARIANO et al., 2005). Os principais gêneros relacionados a esta doença  
15 são *Pectobacterium* e *Dickeya* (CHARKOWISKI, 2018). No entanto, mais espécies  
16 da família *Enterobacteriaceae* foram encontradas associadas à podridão mole de vegetais,  
17 como *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Leliottia*, *Morganella*, *Rahnella* (MORAES, 2018). Altamira,  
18 Benevides, Ananindeua, Santa Isabel, Belém, Igarapé - miri, Tucuruí, Moju e Castanhal, no  
19 estado do Pará, Brasil, são municípios onde casos de podridão mole foram associados aos  
20 gêneros *Klebsiella*, *Raoutella*, *Enterobacter*, *Cronobacter* (CARDOSO,2019),  
21 e *Pectobacterium* (VERGINASSI et al, 2007). No entanto, não se têm informações sobre a  
22 variabilidade patogênica e genética em isolados da região oeste do estado do Pará. Estudos  
23 como esses podem contribuir para a seleção, implementação e avaliação de medidas de controle  
24 integrado desta doença (MICHEREFF et al., 2005).

1 Atualmente, o uso de marcadores moleculares tem se destacado nos estudos de  
2 caracterização genética de microrganismos (ALVARADO, 2006). Dentre as técnicas que  
3 empregam esta ferramenta, a reação em cadeia da polimerase repetida por genoma (rep-PCR),  
4 baseada nos marcadores REP, ERIC e BOX (LOUWS et al., 1994), tem sido utilizada de forma  
5 eficiente em estudos para caracterizar a diversidade genética de bactérias pectinolíticas  
6 (FALEIRO, 2011).

7 Assim, esta pesquisa objetivou realizar a descrição patogênica e molecular de um  
8 conjunto de isolados coletados nos municípios de Belterra, Mojuí dos Campos e Santarém,  
9 oeste do Pará, Brasil, utilizando inoculação artificial em diferentes hospedeiros e características  
10 genéticas (rep-PCR).

11 Nesse sentido, foram coletadas amostras sintomáticas de alface (*Lactuca sativa* L.),  
12 pimentão (*Capsicum annum* L.), couve-folha (*Brassica oleraceae* var. *Acephala* DC.), tomate  
13 (*Solanum lycopersicum* L.), cebolinha (*Allium schoenoprasum* L.), salsa (*Petroselinum crispum*  
14 (Mill.) Nym), chicória (*Eryngium foetidum* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.), entre fevereiro  
15 de 2018 e dezembro de 2019.

16 Setenta e cinco isolados bacterianos foram isolados em placas de Petri com meio de  
17 casaminoácido-peptona-glicose (CPG) (DE BOER & KELMAN, 2001) usando Takatsu et al.  
18 (1981) técnica. Após o isolamento, as placas de Petri foram incubadas por 36 horas a 28° C.  
19 Colônias bacterianas pectolíticas típicas foram isoladas por meio de características  
20 morfológicas descritas por MARIANO et al. (2005) e os isolados foram preservadas em água  
21 destilada esterilizada (ADE) (SOUZA et al., 2016).

22 Para a caracterização patológica, os isolados foram cultivados em meio CPG por 48  
23 horas a 29 ° C, e as colônias bacterianas foram tocadas com bastões de madeira esterilizados  
24 (TAKATSU et al., 1981), que foram utilizados para perfurar a epiderme de frutos de pimenta  
25 (*Capsicum anuum* L.), catafilos de cebola (*Allium isolado* L.), fatias de cenoura (*Daucus carota*

1 subsp. *sativus* L.) e batata (*Solanum tuberosum* L.). Todos os tecidos do hospedeiro foram  
2 previamente desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % por cinco minutos e  
3 lavados em ADE. Quatro experimentos diferentes foram realizados, um para cada hospedeiro.  
4 Cada experimento consistiu de 75 tratamentos (75 isolados), com quatro repetições por  
5 tratamento, sendo cada repetição caracterizada por um ponto de inoculação. Como tratamento  
6 controle as inoculações foram realizadas com ADE. Após 48 h de incubação a 30 °C, o  
7 reisolamento foi realizado para cumprir as etapas dos postulados de Koch. A caracterização  
8 patológica foi qualitativa, considerando a patogenicidade de cada isolado em relação aos  
9 hospedeiros inoculados.

10 Trinta e oito isolados foram selecionados de acordo com a diversidade patogênica e  
11 utilizadas para avaliar a variabilidade genética por rep-PCR. O DNA das isolados foi extraído  
12 conforme GAMA & COVELLO (2016), e posteriormente submetido à técnica de rep-PCR,  
13 utilizando REP, ERIC e BOX (LOUWS et al., 1994). Amostras contendo água ultrapura foram  
14 utilizadas como controle negativo para verificar a ocorrência de contaminantes. As condições  
15 de PCR, corrida eletroforética, fotodocumentação e análise dos perfis gerados foram realizadas  
16 de acordo com MORAES (2018). As análises de agrupamento foram realizadas usando o  
17 coeficiente de similaridade de Jaccard com 70 % de similaridade (GAMA et al., 2011).

18 As 75 isolados obtidas nos diferentes vegetais amostrados formaram cinco grupos de  
19 acordo com a patogenicidade aos hospedeiros avaliados (Apêndice 1). O grupo I foi patogênico  
20 para todos os hospedeiros e compreendeu a 77 % das isolados, enquanto que o grupo II foi  
21 patogênico para batata, pimenta e cebola, o grupo III foi patogênico para batata e pimenta, o  
22 grupo IV foi patogênico apenas para batata e o grupo V foi patogênico para batata, pimenta e  
23 cenoura, abrigaram 12, 7, 3 e 1 % das isolados, respectivamente (Tabela 1). Esses resultados  
24 demonstraram que as isolados da região apresentam alta variabilidade patogênica, corroborando

1 as descrições de MARIANO et al. (2005) e AKBAR et al. (2015) para  
2 o gênero *Pectobacterium*.

3 Por meio da análise visual das impressões digitais geradas a partir do DNA das 38  
4 isolados submetidas à análise de rep-PCR, foi possível observar a amplificação de 33, 35 e 34  
5 bandas reprodutíveis entre 250 e 10.000 bp para ERIC, REP e BOX -PCR, respectivamente,  
6 apresentando alto grau de polimorfismo nos isolados analisadas. Trinta e cinco grupos foram  
7 obtidos com 70 % de similaridade com a análise de agrupamento realizada com os três  
8 marcadores (Figura 1), indicando que provavelmente diferentes gêneros e espécies estão  
9 associados à podridão mole de vegetais no oeste do Pará. Diferentes gêneros que causam  
10 podridão mole foram identificados em outros estudos (SEO et al., 2002; ALVARADO, 2006;  
11 MORAES, 2018). Não foi identificada relação entre grupos genéticos, grupos de  
12 patogenicidade, localização geográfica ou com os hospedeiros originais, semelhante aos  
13 resultados obtidos por MAISURIA & NERUKAR (2013) e ALVARADO et al. (2011).

14 Os resultados demonstraram a alta variabilidade patogênica e diversidade genética de  
15 isolados de bactérias causadoras de podridão mole associadas a diferentes espécies de olerícolas  
16 cultivadas na região oeste do Pará, revelando que devem ocorrer diferentes gêneros e espécies  
17 destas bactérias nesta região. No futuro, isolados representativos desta região serão  
18 identificadas em nível de gênero e espécie, o que ajudará a estabelecer técnicas de controle  
19 integrado e medidas que cobrem um amplo espectro de patógenos.

20

## 21 **AGRADECIMENTOS**

22 Este estudo utilizou recursos da “Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)” e da  
23 “Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)”, Brasil.

24

25

## 1 **DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES**

2 Os autores declaram não haver conflito de interesses.

3

## 4 **CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES**

5 RS, MASG e HVMC planejaram a obra. HVMC, RS e LJSS realizaram coletas de campo, testes  
6 de patogenicidade e caracterização patológica das isolados. HVMC e LJSS realizaram análises  
7 moleculares e estatísticas. HVMC, RS, MASG e LJSS escreveram o manuscrito. RS, MASG,  
8 EBS e ADBB traduziram e revisaram o manuscrito.

9

## 10 **REFERÊNCIAS**

11

12 AKBAR, A. et al. Characterization of the causal organism of soft rot of tomatoes and other  
13 vegetables and evaluation of it's most aggressive isolates. **American Journal of Plant**  
14 **Sciences**, v. 6, n. 4, p. 511-517. 2015. Available from:  
15 <<http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.64055>>. Accessed: Oct. 13, 2020. doi:  
16 10.4236/ajps.2015.64055.

17 ALVARADO, I.D.C.M. **Variabilidade e ecologia de *Pectobacterium carotovorum* subsp.**  
18 ***carotovorum*, agente da podridão-mole em couve-chinesa.** 2006. 102f. Tese (Doutorado em  
19 Fitopatologia) – Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de  
20 Pernambuco.

21 BOER, S. H. DE; KELMAN, A. *Erwinia* Soft Rot Group In: SCHAAD N.W.; JONES J.B.;

22 CARDOSO, S. V. D. **Identificação de Bactérias causadoras de podridões moles de**  
23 **ocorrência nos estados do Pará e Minas Gerais.** 2019. 59f. Dissertação (Mestrado) Pós-  
24 graduação em Agronomia/ Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras-  
25 MG.

- 1 CHARKOWSKI, A. O. The changing face of bacterial soft-rot diseases. **Annu. Rev.**  
2 **Phytopathol.** v. 56, p. 269-288. 2018.
- 3 FALEIRO, F. G. **Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em**  
4 **programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento**  
5 **genético vegetal.** Distrito Federal: EMBRAPA, 2011. p.730
- 6 GAMA, M. A. S.; COVELLO, V. N. Técnicas moleculares I - detecção e identificação de  
7 bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R.; SOUZA, E.B. **Manual de práticas em**  
8 **Fitobacteriologia.** Recife: EDUFERPE, 2016, Cap. 17, p.183–198.
- 9 LIAO, C.; HUNG, H.; CHATTERJEE, A.K. An extracellular pectate lyase is the pathogenicity  
10 factor of the soft-rotting bacterium *Pseudomonas viridiflava*. **Molecular Plant-Microbe**  
11 **Interactions,** v. 1, n.5, p.199-206, 1988. Available from:  
12 <[https://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1988Articles/Microbe01\\_](https://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1988Articles/Microbe01_199.pdf)  
13 [199.pdf](https://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1988Articles/Microbe01_199.pdf)> Accessed: Oct., 13,2020
- 14 LOUWS, F. et al. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and  
15 *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and**  
16 **Environmental Microbiology,** v. 60, p. 2286-2295. Available from:  
17 <<https://aem.asm.org/content/60/7/2286>>. Accessed: Oct. 13,2020. doi:  
18 10.1128/AEM.60.7.2286-2295.1994.
- 19 MAISURIA, B. V.; NERUKAR, A. S. Characterization and differentiation of soft rot causing  
20 *Pectobacterium carotovorum* of Indian origin. **European Journal of Plant Pathology.** v. 136,  
21 n. 1, p. 87-102, 2013. Available from: <[https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-012-](https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-012-0140-0#auth-Anuradha_S_-Nerurkar)  
22 [0140-0#auth-Anuradha\\_S\\_-Nerurkar](https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-012-0140-0#auth-Anuradha_S_-Nerurkar)>. Accessed: Oct. 13. doi: 10.1007/s10658-012-0140-0.
- 23 MARIANO, R. De L. R. et al. Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros  
24 *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica.** v.  
25 2, p. 121-153, 2005. Available from:

- 1 <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34246/1/AAPCA-V2-Revisao-04.pdf>>.
- 2 Accessed: Oct. 13.
- 3 MICHEREFF, S. J. et al. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**.
- 4 Recife: Imprensa universitária, 2005. 398 p.
- 5 MORAES, A.J.G. **Diversidade de bactérias causadoras de podridão mole em hortaliças no**
- 6 **estado de Pernambuco**. 2018. 109f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Curso de Pós-
- 7 graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2018.
- 8 SOUZA, E. B. et al. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R.; SOUZA,
- 9 E.B. **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. Recife: EDUFERPE, 2016, Cap. 4, p. 37-49.
- 10 TAKATSU, A. et al. Fruto do pimentão como meio parcialmente seletivo para o isolamento de
- 11 *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 550-551, 1981.

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

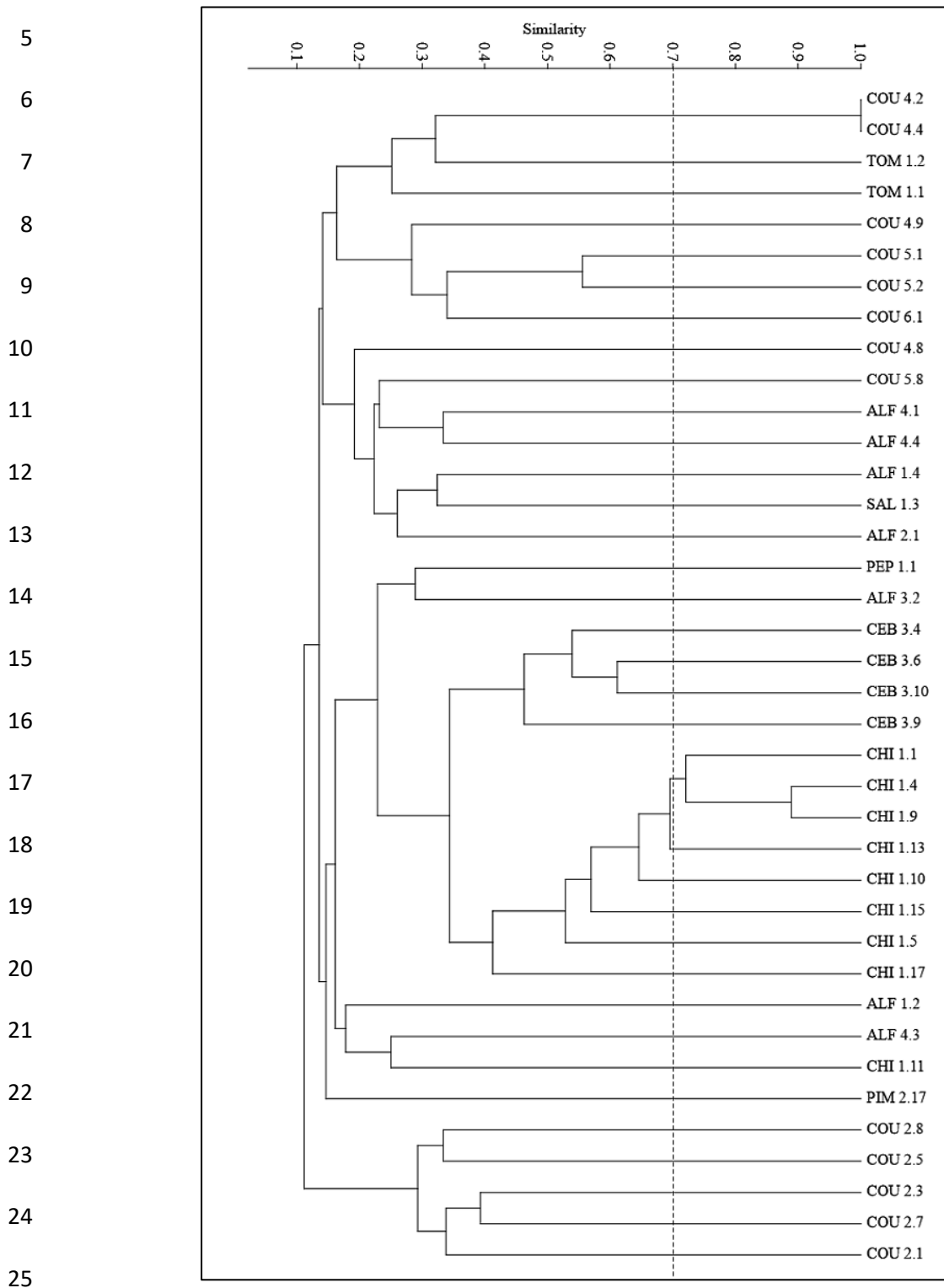
- 1 Tabela 1 - Grupos de patogenidade de isolados de bactérias pectinolíticas de acordo com a  
 2 reação aos diferentes hospedeiros

Grupo de patogenicidade	Hospedeiro				Percentual de isolados
	Batata	Pimentão	Cebola	Cenoura	
I	+ <sup>1</sup>	+	+	+	77
II	+	+	+	-	12
III	+	+	-	-	7
IV	+	-	-	-	3
V	+	+	-	+	1

- 3 <sup>1</sup> + reação positiva; - reação negativa.

4

1 Figura 1 - Dendrograma baseado no Método de Grupos de Pares Não Pareados com Média  
2 Aritmética, de acordo com os perfis gerados por REP, ERIC e BOX-PCR mostrando a relação  
3 entre isolados de bactérias pectinolíticas obtidas de diferentes vegetais cultivados na região  
4 oeste do Estado do Pará



1

2 ORCID:

3 Henara Valéria Miranda Castro - <https://orcid.org/0000-0003-0336-7943>4 Leandro Jun Soki Shibutani - <https://orcid.org/0000-0003-3864-4912>

5 Robinson Severo -

6 Ana Dulce Botelho Baia - <https://orcid.org/0000-0003-4715-865X>7 Elineide Barbosa de Souza - <https://orcid.org/0000-0003-1281-3490>8 Marco Aurélio Siqueira da Gama - <https://orcid.org/0000-0001-6153-1700>

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estudo etiológico identificou alta variabilidade cultural, patogênica e diversidade genética dos isolados causadores de podridão mole em hortaliças na região Oeste do Pará, Brasil. Em função disso, é bem provável que mais de um gênero e espécies estejam associados à doença nesta região, até mesmo bactérias não comumente relatadas em literatura pertencentes à família Enterobacteriaceae. Para pesquisas futuras, sugere-se o aumento do espectro amostral para estudar a correlação entre os fatores variabilidade cultural, patológica e diversidade genética, bem como a identificação molecular dos isolados.

**APÊNDICE**

## Apêndice 1 – Quadro de patogenicidade

(continua)

Grupo	Isolado	Batata	Pimentão	Cebola	Cenoura	%
I	ALF 1.1	+	+	+	+	77
	ALF 1.2	+	+	+	+	
	ALF 1.4	+	+	+	+	
	ALF 4.3	+	+	+	+	
	ALF 4.5	+	+	+	+	
	CEB 1.1	+	+	+	+	
	CEB 2.1	+	+	+	+	
	CEB 2.2	+	+	+	+	
	CEB 2.3	+	+	+	+	
	CEB 3.4	+	+	+	+	
	CEB 3.6	+	+	+	+	
	CEB 3.6-2	+	+	+	+	
	CEB 3.9	+	+	+	+	
	CEB 3.9-2	+	+	+	+	
	CEB 3.10	+	+	+	+	
	CEB 3.10-1	+	+	+	+	
	CEB 3.10-2	+	+	+	+	
	CEB 3.10-3	+	+	+	+	
	CHI* 1.1	+	+	+	+	
	CHI 1.4	+	+	+	+	
	CHI 1.5	+	+	+	+	
	CHI 1.9	+	+	+	+	
	CHI 1.10	+	+	+	+	
	CHI 1.12	+	+	+	+	
	CHI 1.13	+	+	+	+	
	CHI 1.14	+	+	+	+	
	CHI 1.15	+	+	+	+	
	CHI 1.16	+	+	+	+	
	CHI 1.17	+	+	+	+	
	COU 1.1	+	+	+	+	
	COU 2.1	+	+	+	+	
	COU 4.9	+	+	+	+	
COU 4.11	+	+	+	+		
COU 5.1	+	+	+	+		
COU 5.3	+	+	+	+		
COU 5.7	+	+	+	+		
COU 5.8	+	+	+	+		

## Apêndice 2 - Quadro de patogenicidade

(conclusão)

Grupo	Isolado	Batata	Pimentão	Cebola	Cenoura	%
	PEP 1.1	+	+	+	+	
	PEP 1.2	+	+	+	+	
	PIM 1.1	+	+	+	+	
	PIM 1.2	+	+	+	+	
	PIM 1.4	+	+	+	+	
	PIM 1.5	+	+	+	+	
	PIM 2.1	+	+	+	+	
	PIM 2.3	+	+	+	+	
	PIM 2.4	+	+	+	+	
	PIM 2.5	+	+	+	+	
	PIM 2.6	+	+	+	+	
	PIM 2.7	+	+	+	+	
	PIM 2.7-1	+	+	+	+	
	PIM 2.11	+	+	+	+	
	PIM 2.12	+	+	+	+	
	PIM 2.17	+	+	+	+	
	PIM 3.10	+	+	+	+	
	PIM 4.11	+	+	+	+	
	SAL 1.1	+	+	+	+	
	TOM 1.1	+	+	+	+	
TOM 1.3	+	+	+	+		
II	ALF 1.2	+	+	+	-	12
	ALF 2.1	+	+	+	-	
	ALF 3.1	+	+	+	-	
	COU 2.7	+	+	+	-	
	COU 2.8	+	+	+	-	
	COU 4.8	+	+	+	-	
	COU 5.2	+	+	+	-	
	COU 5.5	+	+	+	-	
	COU 6.1	+	+	+	-	
III	ALF 3.2	+	+	-	-	7
	ALF 4.1	+	+	-	-	
	COU 2.3	+	+	-	-	
	COU 2.5	+	+	-	-	
	COU 4.4	+	+	-	-	
IV	CHI 1.11	+	-	-	-	3
	COU 4.2	+	-	-	-	
V	ALF 4.4	+	+	-	+	1

**ANEXOS**

## **Anexo 1-** Normas para publicação da revista Ciência Rural

### **ESCOPO:**

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados preferencialmente em idioma Inglês. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1º rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso não traduzidos nesta etapa e se aprovados para publicação, terão que ser obrigatoriamente traduzidos para o Inglês por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

### **Empresas credenciadas:**

- American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com/>)
- Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
- Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.
- Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.
- GlobalEdico (<http://www.gloaledico.com/>)
- JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
- Liberty Medical Communications (<http://libertymedcom.com/>)
- Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
- Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)

### **LIMITE DE PÁGINAS:**

Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem. Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos com páginas adicionais além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que possuem páginas excedentes terão um custo adicional para a publicação (vide taxa).

### **ESTRUTURA:**

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão ou resultados/discussão (juntos); Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética

institucional já na submissão. Alternativamente, pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com Introdução; Metodologia; Resultados e Discussão e Conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano Declaração Modelo Animal).

#### **COVER LETTER:**

6. O preenchimento do campo "cover letter" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, exceto para artigos submetidos em português (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês)

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte tutorial.

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista

[www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

#### **TÍTULOS:**

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos:

Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. Nesse link é disponibilizado o arquivo de estilo para uso com o software EndNote (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse link o arquivo de estilo para uso com o software Mendeley.

## REFERÊNCIAS:

11. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista:

### 11.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. The practice of large animal surgery. Philadelphia: Saunders, 1985. 2v.  
TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Manaus: INPA, 1979. 95p.

### 11.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. The thyroid. Baltimore: Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

### 11.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. Sampling techniques. 3.ed. New York: John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90. TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte. São Paulo: Roca, 1985. p.29-40.

### 11.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Product Research*, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. *Ciência Rural*, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 47, n.3, e20150705, 2017. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-)

84782017000300151&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

#### 11.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. Anais... Santa Maria: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

#### 11.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad). 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

#### 11.7. Boletim:

ROGIK, F.A. Indústria da lactose. São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

#### 11.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo

: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

#### 11.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico. São Paulo :Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. Proceedings... Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

UFRGS. Transgênicos. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. Maturitas, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <[http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina.

Anais...Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

#### DESENHOS, GRÁFICOS E FOTOGRAFIAS:

12. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação Quadro . As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos, as figuras e os gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

13. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

15. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (com decisão de Reject and Resubmit) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por decurso de prazo não terão a taxa de tramitação reembolsada.

20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

#### CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:

21. Contribuição dos autores

Para se qualificar para a autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados deveriam ter contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto para sua preparação. Por favor, use um dos exemplos abaixo ou faça o seu.

Exemplo um:

RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA realizaram os experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB supervisionou e coordenou os experimentos com animais e forneceu dados clínicos. BB realizou análises estatísticas de dados experimentais. WC, MB e NO prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Exemplo dois:

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Exemplo três

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito

ORCID:

21. O ORCID (Open Research and Contributors Identification) permite a criação de identificadores digitais únicos (ORCID ID) para pesquisadores, facilitando a identificação nacional e internacional do pesquisador e sua produção. Dessa forma recomendamos que todos os autores de cada submissão adotem o registro ORCID em suas publicações.

Ciência Rural  
Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais  
Prédio 42, Sala 3104 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil  
E-mail: [cienciarural@mail.ufsm.br](mailto:cienciarural@mail.ufsm.br)  
Fone/Fax: (55) 32208698  
Fax: (55) 32208695