

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da resistência de plantas ornamentais ao
agente da Podridão Mole**

Diego da Paixão Alves

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**Avaliação da resistência de plantas ornamentais ao agente da Podridão
Mole**

DIEGO DA PAIXÃO ALVES

Sob a Orientação do Professor
Paulo Sérgio Torres Briosso

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Fitossanidade.

Seropédica, RJ
Julho de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474a Alves, Diego da Paixão, 1989 Avaliação da
resistência de plantas ornamentais ao agente da
Podridão Mole / Diego da Paixão Alves. Rio de
Janeiro, 2022.
62 f.: il.

Orientador: Paulo Sergio Torres Bioso.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, 2022.

1. Bactérias Fitopatogênicas. 2. Pectobacteria. 3.
Fitossanidade. 4. Podridão Mole. 5. PCR. I. Bioso,
Paulo Sergio Torres, 1956-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA**

DIEGO DA PAIXÃO ALVES


Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, ao Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de concentração em Fitossanidade.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM __/__/__



Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso – UFRRJ / L.O.D.F.

(Orientador)



Dra. Vanessa Gomes Kelly Almeida – UFRRJ / IQ



Dr. Fábio Souto de Almeida – UFRRJ / ITR

DEDICATÓRIA

A Vera Lucia da Silva, minha tia amada, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Todo Poderoso e a Nossa Senhora por sempre me acompanhar e permitir aos anos de aprendizado nesta instituição.

Aos meus pais Rosimar Paixão e Altamiro Alves e meu irmão Lucas Alves, pelo apoio, me fazendo acreditar que eu era capaz, e fui.

Ao meu orientador, Paulo Sergio Torres Brioso, onde estive sempre pronto a me socorrer, me ajudando a seguir em frente e me ensinando diariamente.

A Vanessa Gomes Kelly Almeida e ao Fábio Souto de Almeida, pela disponibilidade de fazer parte da banca de avaliação deste trabalho.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, lugar onde pude viver, chamar de lar e levar comigo minha profissão que tanto amo. Obrigado por tudo.

Ao Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, por todo suporte para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, por todo conhecimento adquirido. Vocês foram essenciais para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Durval Mariano, pelo companheirismo e apoio durante esses anos.

Aos meus amigos do Laboratório Oficial de Diagnostico Fitossanitário, Thais Paula, Savana Lemes, Douglas Proque, Nathalia Roque, Iana Lucena, Tuany Candida, Patrícia, Ivanete e Etiene Correia. Obrigado pelos dias que passamos juntos e por tornarem meus dias mais leves.

Aos meus amigos do coração, Melina Alves, Fernanda Gabetto, Grace Gevaerd, Gabriela Rocha, Fernanda Guimarães, Anderson Pontes, Vanessa Gomes, Aline Dantas, Gabriele Oliveira, Fernanda Garcia, Bruna Ribas, Danielle Rocha, Isabela Rezende, Leonardo Duffrayer, Pablo Bela, Caio Soares, Luana Teles, Pedro Miller, Anthony Cortês, Cyndi Ferreira, Gabriela Rocha e Carolina Almada e todos os outros que estiveram comigo durante esses anos, saibam que vocês são especiais e que foram peças fundamentais para meu sustento psicológico nessa universidade.

Aos meus velhos amigos Felipe Carvalho, Kelly Aguiar, André Aguiar, Pedro Aguiar, Olinda Valente, Renan Valente, Lara Valente, Glaucia Sant'Ana, Geovane Oliveira, Rosemeiry Brasil e Mayla Carvalho, que não desistiram de mim, obrigado por entenderem minha ausência.

Ao Roberto e a Rubi, por serem meu apoio emocional, onde me ajudaram a passar os momentos de estresse e ansiedade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigado!

RESUMO

ALVES, Diego da Paixão. **Avaliação da resistência de plantas ornamentais ao agente da Podridão Mole**. 2022. 62p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

As doenças de plantas são resultadas de processos entre o hospedeiro suscetível, o patógeno virulento e o ambiente favorável, resultando em modificações fisiológicas e morfológicas. Entre esses patógenos está a o causador da Podridão Mole, causada por bactérias pectinolíticas. Esta doença está associada a Plantas Ornamentais, sendo também um problema para outras espécies vegetais. Materiais propagativos de plantas de *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng, *Lilium pumilum* DC. Fisch., *Lilium speciosum* Thunb. e *Tulipa gesneriana* L. são regularmente recebidos para a análise fitossanitária no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, com origem de diversos países. Desses, foram separados os que apresentavam sintomas de podridão mole, com forte odor fétido, contendo possíveis contaminações por bactérias. Foram obtidos dois isolados de bactérias pectinolíticas e foram feitos testes biológicos de isca, teste de Gram, crescimento em meio de cultura enriquecido com solução salina, além do teste de PCR. Após os testes, os dois isolados foram identificados como *Pectobacterium carotovorum*, bactéria que causa grandes danos a diversas culturas no Brasil. Os isolados já identificados, foram inoculados em bulbos a fim de testar a resistência do material propagativo. Além da testagem dos bulbos, também foram feitos testes para recuperação da bactéria na rizosfera de plantas daninhas, encontradas em vasos com o solo contaminado por *Pectobacterium*. Como resultado, foram encontrados bulbos de *Lilium speciosum*, cultivares Vetto, Sisto, Roselily Mônica, Roselily Angêla, Bacardi e Maldano; bulbo de *Tulipa gesneriana*, cultivar Ile de France; bulbos *Zantedeschia aethiopica*, cultivares Royal Princess, Captain Odeon, Captain Ventura, Zazu, Odessa e Royal Vale, suscetíveis a *Pectobacterium carotovorum*. Para facilitar a identificação, foi desenvolvido um *Kit* de diagnóstico biológico e molecular, para a identificação da *Pectobacterium carotovorum*.

Palavras-chave: bactéria, Gram-negativa, Lírio, Tulipa, Zantedeschia, PCR

ABSTRACT

ALVES, Diego da Paixão. **Evaluation of ornamental plant resistance to the soft rot agent.** 2022. 62p. Dissertation (Master in Plant Health and Applied Biotechnology). Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

As diseases of susceptible biological processes among susceptible hosts in organic plants, are and morphological environments favorable in biological, environmental and environmental plants. Among these pathogens is the causative Molelytic Rot, acting by pectin bacteria. This disease is associated with Ornamental Plants, being also a problem for other plant species. Propagation materials from plants of *Zantedeschia aethiopica*, *Lilium* spp. and *Tulipa gesneriana* are regularly received for phytosanitary analysis at the Official Laboratory of Phytosanitary Diagnosis, from different countries. Of these, those who showed symptoms of soft rot, with a strong foul odor, containing possible contamination by bacteria, were separated. There were two pectinolytic bacteria isolates and biological tests of bait, Gram test, growth in culture medium enriched with saline solution, in addition to the PCR test were performed. After the tests, the two isolates were identified as *Pectobacterium carotovorum*, a bacterium that causes great damage to several cultures in Brazil. The isolates already identified were inoculated in bulbs in order to test the resistance of the propagating material. In addition to testing the bulbs, tests were also carried out to recover the bacteria in the weeds, in pots with soil contaminated by *Pectobacterium*. As a result, bulbs of *Lilium speciosum*, cultivars Vetto, Sisto, Roselily Mônica, Roselily Angêla, Bacardi and Maldano were found; bulb of *Tulipa gesneriana*, cultivar Ile de France; *Zantedeschia aethiopica* bulbs, cultivars Royal Princess, Captain Odeon, Captain Ventura, Zazu, Odessa and Royal Vale, offered to *Pectobacterium carotovorum*. To facilitate identification, a biological and molecular diagnostic kit was developed to identify *Pectobacterium carotovorum*.

Keywords: bacteria, Gram-negative, Lily, Tulip, Zantedeschia, PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Bulbos sadios de <i>Lilium speciosum</i> cv. Yelloween.....	6
Figura 2. Bulbo de <i>Zantedeschia aethiopica</i> com sintoma de podridão mole	12
Figura 3. <i>Solanum tuberosum</i> após inoculação com o isolado CO.....	13
Figura 4. Colônias de <i>Pectobacterium</i> observadas em Microscópio Estereoscópio Binocular Wild (120x)	13
Figura 5. Frascos de vidro transparente, com capacidade de 225 mL, utilizados como câmara úmida para o teste de resistência em bulbos.....	16
Figura 6. Estufa B.O.D. FANEM, com câmaras úmidas feitas em frascos de vidro contendo bulbos inoculados e chumaço de algodão embebido em água destilada e deionizada estéril. .	16
Figura 7. Cultivo de plantas ornamentais em vasos de plástico com uso de turfa, na estufa do Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.)	17
Figura 8. Plantas daninhas encontradas nos vasos de plantas ornamentais com solo contaminado. A) <i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC. ex Wight (Falsa serralha). B) <i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb. (Quebra-pedra).....	18
Figura 9. Aspectos morfológicos de isolado bacteriano em Microscópio: A) Colonias de <i>Pectobacterium</i> observadas em Microscópio Estereoscópio Binocular Wild no aumento 250X após 48 horas em temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. B) Teste de Gram observado em Microscópio Ótico Olympus CX 40, no aumento de 1000x.	19
Figura 10. Teste de sensibilidade a NaCl. A) Caldo Nutriente inoculado, enriquecido com NaCl a 1%. B) Caldo Nutriente inoculado, enriquecido com NaCl a 5%. C) Caldo Nutriente com Controle Branco.....	20
Figura 11. <i>Pectobacterium carotovorum</i> isoladoa CO (A) e RP (B). Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, amplificação de DNA por PCR através de primers específicos para <i>Pectobacterium carotovorum</i> (PC). Uso de primers indicados pelas letras EX – primers para detecção de <i>Pectobacterium carotovorum</i> ., D – primers para identificação de <i>Dickeya</i> sp., Y – primers para detecção de <i>Pectobacterium atrosepticum</i> . Marcador de massa molecular (1 kb DNA plus Ladder, Termo Fisher) indicado pela letra M.	21
Figura 14. Bulbo de <i>Tulipa</i> cv. Ile de France, após teste de resistência.....	22
Figura 12. Plantas de <i>Zantedeschia</i> sp. com sintomas de podridão mole.	30
Figura 13. Colônias após repicagem, obtidas após isolamento em Meio 523 da bactéria <i>Pectobacterium carotovorum</i> em folhas de <i>Zantedeschia</i> sp.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Isolados e origem de amostras de <i>Zantedeschia aethiopica</i> infectadas com bactéria.	12
Tabela 2: Resultado do teste de isca biológica a partir da inoculação com cultura pura de isolado bacteriano em meio de cultura 523.....	18
Tabela 3: Resultado do teste de resistência em bulbos de plantas ornamentais, inoculadas com suspensão bacteriana de <i>Pectobacterium</i>	23

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	2
2.1.	Objetivo geral	2
2.2.	Objetivos específicos	2
3.	JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA	2
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
4.1.	Mercado de Ornamentais	3
4.2.	Plantas Ornamentais	4
4.3.	Espécies Ornamentais	5
4.4.	<i>Lilium</i> spp.	5
4.4.1.	Espécies de Lírios.....	6
4.5.	<i>Zantedeschia</i> spp.....	6
4.6.	<i>Tulipa</i> spp.	7
4.7.	Bactérias Fitopatogênicas	8
4.7.1.	Bactérias pectinolíticas	8
4.7.1.1.	<i>Pectobacterium</i> spp.	9
4.7.1.2.	<i>Dickeya</i> spp.	10
4.7.1.3.	<i>Brenneria</i> spp.	10
4.7.1.4.	<i>Lonsdalea</i> spp.....	10
4.7.1.5.	<i>Musicola</i> spp.	10
4.7.1.6.	<i>Sodalis</i> spp.....	11
4.7.1.7.	<i>Biostraticola</i> spp.	11
4.7.1.8.	<i>Acerihabitans</i> spp.....	11
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
5.1.	Obtenção e caracterização de isolados bacterianos, causadoras de podridão mole.....	11
5.2.	Coloração de Gram.....	14
5.4.	Caracterização Molecular	14
5.5.	Teste de resistência em bulbos de <i>Zantedeschias</i> , Tulipas e Lírios.....	15

5.6. Isolamento bacteriano através de Plantas de <i>Zantedeschia</i> naturalmente infectadas e de plantas parasitas e invasoras associadas	17
5.6.1. Teste de recuperação da bactéria por meio de suspensão rizosférica.....	17
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6.1. Obtenção e caracterização de isolados bacterianos, causadoras de podridão mole.....	18
6.2. Coloração de Gram.....	19
6.3. Sensibilidade a Solução Salina	19
6.4. Caracterização Molecular	20
6.5. Teste de resistência em bulbos de <i>Zantedeschias</i> , Tulipas e Lírios.....	21
6.6. Isolamento bacteriano através de Plantas de <i>Zantedeschia</i> naturalmente infectadas e de plantas parasitas e invasoras associadas	30
6.7. Teste de recuperação da bactéria por meio de suspensão rizosférica.	31
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9. ANEXO	40
9.1. BIOMPC - Protótipo de <i>Kit</i> diagnóstico biológico e molecular de <i>Pectobacterium carotovorum</i>	40
9.2. Preparo do Meio de Cultura Batata Dextrose Agar (BDA)	50
9.3. Preparo do Meio de cultura 523 (Kado & Herskett, 1970).....	50

1. INTRODUÇÃO

As doenças de plantas são provenientes de processos dinâmicos entre o hospedeiro e o patógeno, em uma íntima relação com o ambiente, influenciando mutuamente e resultando em modificações fisiológicas, histológicas e morfológicas. De modo simplificado, doenças ocorrem da seguinte forma: por meio de hospedeiros suscetíveis, patógeno virulento e ambiente favorável, podendo o patógeno estar associado ou não a um vetor.

As doenças bióticas, que afetam vegetais, são causadas por fitopatógenos, podendo ser algas, bactérias, chitrídeos, espiroplasmas, fitoplasmas, fungos, moluscos, nematóides, plantas infestantes e parasitas, plasmophorídeos, protozoários, straminipilas, viróides e vírus.

Com relação a tais fitopatógenos, as doenças causadas por bactérias como as das famílias *Erwiniaceae* (por exemplo, gêneros *Erwinia* e *Pantoea*) e *Pectobacteriaceae* (por exemplo, gêneros *Brenneria*, *Dickeya*, *Pectobacterium*), podem ser responsáveis por grandes prejuízos e quando encontram condições favoráveis são limitantes à exploração econômica das plantas. Além disso, os sintomas causados por bactérias fitopatogênicas também podem causar impedimentos de exportações, além de servirem de porta de entrada a outros organismos patogênicos (ALMEIDA, 2006; ADEOLU *et al.*, 2016).

Entre as doenças causadas por fitopatógenos, destaca-se a Podridão Mole, podendo ser causada por bactérias pectinolíticas da família *Pectobacteriaceae* (gêneros *Dickeya*, *Pectobacterium*). Em seu hospedeiro, produzem grande quantidade de enzimas pectinolíticas, que degradam tecidos do parênquima e infectam o hospedeiro vegetal, por meio de aberturas naturais, ferimentos, insetos, ou até mesmo pelo atrito entre as plantas. Após a penetração o início do sintoma é uma lesão com aspecto aquoso, aumentando rapidamente, tornando-se descolorada ou acinzentada. Os tecidos desintegram-se, formando uma massa de células da planta e das bactérias. Esses tecidos infectados, geralmente liberam um odor fétido característico (HAYWARD E MARIANO, 1997; EMBRAPA, 2008; KADO, 2010; FELIX *et al.*, 2016).

As bactérias pectinolíticas podem ser de diferentes gêneros e espécies. Entre elas, destacam-se:

- *Pectobacterium carotovorum*, que é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa, que possui motilidade devido aos seus flagelos ao longo da partícula, sendo classificada como peritríquia. Se desenvolve em temperaturas limitantes de 25°C a 32°C, sendo de melhor crescimento na faixa de 28°C a 30°C. Suas colônias, são circulares, lisas, brilhantes e com coloração creme (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995)

- *Dickeya* spp. que são semelhantes a *Pectobacterium* e muitas vezes confundidas entre si, em meio de cultura. Produzem coloração amarelada em meio de cultura BDA e crescimento rápido a 37°C (SILVA, 2012; CARDOZA, 2015).

- *Brenneria* spp. tem sua temperatura ótima para o desenvolvimento das bactérias em meios de cultura de 30 a 33°C. Dentro desta faixa e com o oxigênio, a bactéria produz uma colônia de cor creme a branca (ANGUIANO *et al.*, 2016).

As bactérias pectinolíticas possuem grande importância econômica, pois afetam diversas culturas, tais como as hortaliças (por exemplo *Beta vulgaris* var. *cicla* L., *Brassica oleracea* var. *capitata* L. *Lactuca sativa* L.) e, possuem grande distribuição geográfica, resultando em perdas acima de 50% em muitas famílias botânicas.

Além de plantas com caráter alimentício, as bactérias pectinolíticas causam danos a diferentes plantas ornamentais, principalmente aquelas que são propagadas vegetativamente por bulbos ou rizomas. Por possuir caráter pectinolítico, degradam a lamela média e as paredes celulares, causando o extravasamento do conteúdo celular, gerando aspecto aquoso, principalmente em armazenamentos em períodos chuvosos. (ROBBS *et al.*, 1992; EMBRAPA, 2008; MANSFIELD *et al.*, 2012).

Plantas ornamentais se diferenciam pela sua forma de florescimento e principalmente pelas cores variadas das flores e folhas. Atendem a um mercado específico, sendo comercializadas, suas flores e folhagens ou a planta em vasos. Também estão ligadas a arquitetura, e são utilizadas em paisagismo. Seu uso está relacionado ao crescimento das cidades, sendo necessária a presença de elementos naturais no dia a dia do ser humano. Além disso, contribuem para a melhoria do ambiente, podendo ser criado microclimas agradáveis (LORENZI & SOUZA, 2001; COSTA & COLESANI, 2011).

Desde 1970, o cultivo e comercialização de plantas ornamentais no Brasil passaram a aumentar o desenvolvimento, sendo considerada uma atividade de importância socioeconômica. O mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil vem se desenvolvendo, onde teve a contribuição dos imigrantes japoneses e holandeses. Devido a atuação, de holandeses, a expansão da produção foi possível, em especial na cidade de Holambra (São Paulo) e distribuídas nos principais mercados varejistas e atacadistas do país. O Brasil destaca-se na produção, possuindo vantagens, como o clima, terra disponível, água, energia e mão-de-obra. O setor, no agronegócio está cada vez mais consistente e relevante. Essa atividade é crescente, agregando potencial de expansão e promovendo renda e emprego, sendo uma das principais atividades para os micros e pequenos produtores do país (MARQUES & CAIXETA FILHO, 2003; BOTELHO *et al.*, 2015; REIS & MARAFON, 2020).

Desta forma, para o Brasil, a avaliação da resistência do material propagativo é necessária, a fim de se conhecer as cultivares dessas plantas que são resistentes a bactérias pectinolíticas, tendo em vista que há pouca informação na literatura sobre este aspecto. Além disso, grande parte do material propagativo de plantas ornamentais é importado de outros países. Sendo assim, é essencial que se produza um método eficaz e rápido de detecção dessas bactérias em especial, em plantas ornamentais propagadas por bulbos ou rizomas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a resistência de material propagativo (bulbos) de Plantas Ornamentais a bactéria pectinolíticas.

2.2. Objetivos específicos

- Detectar biologicamente e molecularmente a espécie de bactéria associada a Podridão Mole em elementos de propagação de Plantas Ornamentais destinadas ao Agronegócio;
- Produzir insumos básicos (fragmentos genômicos amplificados) para as espécies de bactérias associadas à Podridão Mole em elementos de propagação de Plantas Ornamentais destinadas ao Agronegócio;
- Elaborar um protótipo de *kit* de diagnóstico (biológico e/ou molecular) para a bactéria de importância quarentenária ou não, através de processos biotecnológicos.

3. JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA

Atualmente, tanto nacionalmente como internacionalmente, dispõe-se de poucos trabalhos visando à detecção a nível molecular de fitopatógenos em elementos de propagação vegetativa. Propõe-se então, a identificação de possível fonte de resistência bem como de *kits* de diagnóstico biológico e molecular, que seriam de pronto uso de forma a se ter disponibilidade de material de propagação indexado, certificado e sadio, bem como material de propagação apresentando resistência genética a tais fitopatógenos (em especial, bactérias pectinolíticas).

Estas informações constituem um apoio rápido, sensível e indispensável na elaboração de programas de melhoramento genético, de levantamento fitossanitário e epidemiológico, assim

como, para estratégia de controle, possibilitando a diminuição das perdas e dos custos com a cultura.

A execução do presente trabalho contribuirá para um avanço na Patologia de Elementos de Propagação de Plantas Ornamentais através do uso de testes biológicos e/ou moleculares, para a disponibilidade de material propagativo isento de fitopatógeno assim como para a obtenção de produtos e/ou processos biotecnológicos, contribuindo indiretamente no aumento da produtividade da cultura.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Mercado de Ornamentais

O seguimento de flores e plantas ornamentais no Brasil vem sendo desenvolvido ao longo do tempo, e teve contribuição expressiva dos imigrantes, tendo como destaque os japoneses e holandeses. Devido a essa atuação, especialmente de holandeses no estado de São Paulo, a expansão da produção foi possível, visto que aos poucos foram se organizando em âmbito nacional. Desse modo, a presença destas são notadas na cidade de Holambra e distribuídas nos principais mercados varejistas e atacadistas do país (REIS & MARAFON, 2020).

De acordo com Marques e Caixeta Filho (2003), vale destacar que o Brasil possui diversas vantagens na produção de flores, como o clima adequado, terra disponível, água, energia e mão-de-obra. Além disso, a rentabilidade dos negócios da floricultura reforça a capacidade de crescimento do setor.

O setor de flores e plantas ornamentais no agronegócio brasileiro está cada vez mais consolidado de forma consistente e relevante. Essa atividade econômica crescente merece especial atenção, pois não só agrega alto potencial de expansão, mas também possui um papel social importante, devido a promoção de renda e emprego, representando uma das principais atividades que contribuem para os micros e pequenos produtores em todo o país (BOTELHO *et al.*, 2015).

A comercialização de plantas ornamentais demonstra crescimento no Brasil. Dados do Sebrae (2015) mostram que o mercado dessas plantas no país movimentou 5,22 bilhões no ano de 2013, onde por sua vez, houve um crescimento de 8,3% com relação ao faturamento do ano anterior.

O seguimento apresenta em sua maioria, a produção e comercialização destinada ao paisagismo e jardinagem, representado por 41,55%, seguido então por espécies vegetais de corte, onde se destaca com 34,33% e por fim, as envasadas, que são representadas pela fatia de 24,12% do mercado, desse mesmo ano. Em termos de evolução, ao comparar ao ano de 2008, o ano de 2013 obteve um crescimento de 4,12% em plantas comercializadas em vasos.

É importante destacar que, no Brasil, o aumento da produção e comercialização de plantas ornamentais só é possível devido a pesquisas aplicadas na área ornamental, o que tem contribuído para o desenvolvimento de novas tecnologias e o aumento da produtividade desses vegetais. Essas, por sua vez, são essenciais para alcançar a viabilidade econômica da produção comercial e o desenvolvimento de mais variedades resistentes, que são adaptadas a diferentes climas, condições e fitopatógenos (BOTELHO *et al.*, 2015).

Ainda, de acordo com o levantamento feito pelo Sebrae (2015), a comercialização de plantas envasadas apresenta relevância no número de vendas, devido a melhor relação custo/benefício das espécies cultivadas àquelas oferecidas já cortadas, devido a maior durabilidade e praticidade. Além de se adaptarem melhor ao estilo de vida atual, requerem menos espaço para o cultivo, além de menor tempo de dedicação pelo consumidor.

Embora o comércio de plantas ornamentais e flores seja presente ao longo de todo o ano, observa-se um crescente aumento de vendas em datas comemorativas, como Dia das Mães, dos Namorados e Finados. Sabendo disso, torna-se importante ao produtor o planejamento da

produção, a fim de produzir de acordo com a demanda do mercado. Devido a isso, deixa-se em evidência o fluxo estabelecido pelo mercado, independente das condições naturais, pois dependendo da época do ano, mesmo com condições ambientais desfavoráveis, a frequência dos fluxos será mais ou menos intensa (REIS & MARAFON, 2020).

O estudo feito por Lima Junior *et al.* (2015), demonstra que as importações no ano de 2014 alcançaram US\$ 46,81 milhões em flores e plantas ornamentais e US\$ 23,81 milhões em exportações. Devido a isso, é possível dizer que o mercado interno cresceu em até seis vezes nos últimos anos, enquanto a exportação se manteve estável. Esse comportamento denota crescente demanda do mercado interno.

De acordo com os dados do Sebrae (2015), em 2013, a produção de plantas e flores foi concentrada na região Sudeste, onde contava com 83,48% do produto nacional, seguida pelas regiões Sul, com 8,12%; Nordeste, chegando a 6,87%, Centro-Oeste com a marca de 1,14% e pôr fim a região Norte, tendo a produtividade de 0,39%.

Em 2017, o Brasil atingiu a marca de R\$7,3 bilhões de reais no comércio de plantas e flores ornamentais, tendo um crescimento de 9,0% com relação ao ano anterior e em 2018, houve um faturamento de R\$7,9 bilhões, também com crescimento de 9,0%. Isso demonstra que, o segmento de espécies vegetais ornamentais, foi um dos que mais cresceu nas últimas duas décadas e, mesmo em tempos de crise, continua mostrando números positivos. Esse crescimento é dado devido a quantidade de novidades que o mercado disponibiliza aos consumidores, tanto do mercado nacional quanto do internacional (IBRAFLOR, 2019; FONTES *et al.*, 2018).

Em 2020, o setor de plantas ornamentais sofreu uma queda de 30% com a pandemia do coronavírus. Embora seja recente, o mercado de ornamentais teve grandes prejuízos, como por exemplo a não comercialização de flores de corte, onde tiveram que ser descartadas na própria propriedade, pois era inviável mandá-las para o mercado. Com a retomada do mercado, em 2021 há falta de produtos, devido ao encerramento de atividades de alguns produtores, como precaução para evitar novos prejuízos. Acredita-se que em 2022, a produção de flores e plantas de ornamentais será normalizada (IBRAFLOR, 2020).

4.2. Plantas Ornamentais

Plantas ornamentais são espécies vegetais, que se diferenciam pelo seu florescimento, estrutura, cores das flores e folhas. Tem por finalidade atender a um mercado específico, onde são comercializadas as flores e folhagens de corte ou podendo ser envasadas também. Além dessas finalidades, as ornamentais também estão ligadas a arquitetura, onde são muito utilizadas em projetos paisagísticos (LORENZI & SOUZA, 2001).

O uso dessas plantas é feito pelo homem desde a Antiguidade. Civilizações antigas já tinham a necessidade de obter espécies vegetais pelo simples prazer estético. Embora o segmento possa transmitir uma ideia de frivolidade, o uso de ornamentais está relacionado diretamente com questões de relevância nos campos ambiental, como o uso de plantas alóctones (espécies não nativas) que podem gerar consequências negativas ao ambiente em que se introduz a espécie, e pelo ponto de vista do agronegócio, onde afeta diretamente o campo socioeconômico, sendo de alta rentabilidade e ao mesmo tempo podendo contribuir para a diminuição do êxodo rural (SMORIGO & JANK, 2001; HEIDEN *et al.*, 2006).

O uso destas plantas está relacionado ao aumento da urbanização das cidades. Devido a isso, tornou-se necessária a presença de constituintes naturais no dia a dia do homem, desempenhando diferentes funções ecológicas, sociais e de lazer, por exemplo. Além disso, contribuem para melhoria da saúde populacional e do ambiente, através do controle microclimático, minimização da poluição do ar e sonora, podendo até mesmo melhorar a qualidade dos ventos (COSTA & COLESANI, 2011).

4.3. Espécies Ornamentais

Como dito anteriormente, Lorenzi (2001), definiu as plantas ornamentais como vegetais diferenciados por seu hábito de crescimento e características fenotípicas, com a finalidade de trazer a natureza para próximo do ser humano, sendo essas espécies envasadas, no paisagismo ou até mesmo em sua versão de corte. Essas espécies podem ser autóctones ou alóctones, sendo a segunda, a mais utilizada.

Entre as espécies de plantas ornamentais, pode-se destacar as do gênero *Lilium* spp., as do gênero *Zantedeschia* e as do gênero *Tulipa* L. Ambas são alóctones, ou seja, foram introduzidas no país e com finalidade ornamental.

4.4. *Lilium* spp.

O lírio é uma planta bulbosa do gênero *Lilium*, pertencente à família *Liliaceae*. Muito apreciada por suas belas flores, são cultivadas para fins comerciais, podendo ser vendidas envasadas ou como flores de corte, onde são tradicionalmente utilizadas para decoração de ambientes (SOARES *et al.*, 2012). Algumas evidências existentes, mostram que, desde os tempos antigos, algumas espécies, como o lírio branco (*Lilium candidum* L), já eram cultivados com a finalidade ornamental, para compor interiores e paisagismo ao ar livre (BOTELHO, 2015).

Os lírios são plantas ornamentais populares desde o período minoico médio (1750 – 1675 a.C., quando vasos e afrescos de Creta eram pintados com esta planta, ilustrando sua bela cor branca e, fragrância elegante. O gênero *Lilium* possui seu centro de origem no Hemisfério Norte, principalmente no continente Asiático, Europeu e na América do Norte. A família *Liliaceae* compreende mais de 80 espécies, sendo distribuídas por toda sua região de origem (LIM & VAN TUYL, 2006).

Por ser uma planta comum no segmento de ornamentais, o Lírio é bastante popular no mercado de flores, sendo a quinta planta mais vendida no mundo e a terceira no Brasil. Essa importância econômica se dá, devido ao seu fácil manejo, com custo de produção baixo e ciclo curto, tendo um retorno econômico rápido. Há uma estimativa que mostra que para a produção de lírios são plantados de 20 a 22 milhões de bulbos por ano. Desse número, 60% são destinados a flores de corte e 40% para plantas comercializadas em vasos (FRÁGUAS, *et al.*, 2002; TIMBOLATO, *et al.*, 2010).

O lírio possui flores de diversas cores, sendo a planta desenvolvida a partir de um bulbo escamoso perene. Nesse bulbo está presente uma gema central caulinar que ao se desenvolver forma um caule com as folhas que onde futuramente resultará em flores. Na base do bulbo se desenvolvem mais gemas de onde se originam os bulbilhos. Esses, por sua vez, produzem raízes grossas. Além disso, são responsáveis pela propagação de uma nova planta (FRÁGUAS *et al.*, 2002).



Figura 1: Bulbos sadios de *Lilium speciosum* cv. Yelloween

4.4.1. Espécies de Lírios

A cultura do lírio possui, no Brasil, quatro espécies economicamente importantes para o mercado de flores que são:

- Lírio Japonês (*Lilium longiflorum* Thunb): são de origem japonesa, apresentam flores com coloração branca e creme. Sua propagação é de fácil condução. Geralmente florescem entre os meses de setembro e novembro. Possuem um período de florescimento de 14 a 17 semanas.
- Lírio Oriental (*Lilium speciosum* Thunb): também são originários do Japão, possuem características marcantes como seu forte perfume e maior longevidade, além de possuir flores grandes, folhas largas e menos numerosas. Suas flores possuem cores branca e rosa e seu período de florescimento é de 14 a 19 semanas.
- Lírio Asiático (*Lilium pumilum* Thunb): Apresentam flores pequenas, folhas estreitas e curtas, além de menor tamanho caular. A coloração de suas flores é com cores fortes e variadas, além de possuir um perfume menos acentuado que a oriental. Florescem mais rápido que as outras variedades, entre 10 e 13 semanas.
- Lírio Híbrido: produzem plantas com formato próximo ao asiático, porém com flores maiores, como o ocidental. São resultado do cruzamento de lírios asiáticos com nativos brasileiros (PERTWEE, 1999; FRÁGUAS et al, 2002).

Os lírios podem ser quiescentes ou dormentes no inverno. Os que permanecem em dormência precisam passar pelo processo de quebra de dormência, podendo ele ser natural, através do frio natural no inverno, combinado com umidade ou artificial através do processo de vernalização. Esse procedimento ocorre através do resfriamento e aumento da umidade do bulbo, onde é necessário que ocorra em seis semanas no mínimo, com temperatura a 5°C (FRÁGUAS et al., 2002).

4.5. *Zantedeschia* spp.

Zantedeschia, comumente conhecida como Copo-de-leite, é uma planta pertencente à família Araceae. Sua propagação é feita por bulbos e é cultivada para fins paisagísticos, sendo uma planta de introdução muito antiga no país, cujo registro se perde no tempo. No ponto de vista econômico, a *Zantedeschia* se destaca como espécie utilizada como Araceae ornamental, assim como os antúrios (*Anthurium andreaeanum* Linden ex Andre), filodendros (*Philodendron* spp.), lírio-da-paz (*Spathiphyllum* spp.), costela-de-adão (*Monstera deliciosa* Liebm.) e a jibóia (*Epipremnum pinnatum* L.) (SOUZA & LORENZI, 2012).

Em muitas espécies de Araceae, ocorre a presença de oxalato de cálcio em suas folhas, tornando-as venenosas, como a popular comigo-ninguém-pode (*Dieffenbachia amoena* Bull.), que apesar da característica também é cultivada como planta ornamental (SOUZA & LORENZI, 2012). As inflorescências da família Araceae são do tipo espádice simples, onde são compostas de bráctea (espata) colorida e vistosa, flores pouco vistosas, bissexuadas ou unissexuadas (SOUZA & LORENZI, 2012).

Originária da África Austral, parte ao sul do continente africano, tem por predominância os países como a África do Sul, Angola, Malawi, Nigéria, Zâmbia, entre outros (SINGH *et al.*, 1996; KUEHNY, 2000). Essas plantas foram introduzidas pelo mundo, como flores de corte, podendo também ser comercializadas em vasos, utilizadas em jardins, e como plantas para ornamentação. A flor foi desenvolvida, para uma variedade de cores, principalmente nos Estados Unidos, Holanda e Nova Zelândia (GUTTMAN *et al.*, 2021).

O gênero *Zantedeschia* possui oito espécies, sendo uma delas com duas subespécies distintas. São classificadas em dois grupos, sendo o primeiro caracterizado por *Zantedeschia aethiopica* e *Zantedeschia odorata*, popularmente conhecida como copo de leite branco. Em regiões endêmicas, florescem no final do inverno e início da primavera, mantendo suas folhas que possuem formato de seta e com coloração verde (sem manchas), sem que ocorra período de dormência. O segundo grupo é caracterizado por plantas que possuem um período de dormência e devido a isso perdem suas folhas durante o inverno, florescendo durante a primavera e verão, além de possuírem inflorescências com coloração variada, contando com seis espécies: *Zantedeschia albomaculata*, *Zantedeschia elliottiana*, *Zantedeschia jucunda*, *Zantedeschia pentlandii*, *Zantedeschia rehmannii* e *Zantedeschia valida* (WU *et al.*, 2016; LETTY, 1973; MUÇOUÇA, 2002; GUTTMAN *et al.*, 2021).

As *Zantedeschias* são propagadas facilmente por meio da reprodução vegetativa, porém, seu desenvolvimento hortícola é limitado devido à alta sensibilidade à podridão mole bacteriana (GUTTMAN *et al.*, 2021).

4.6. *Tulipa* spp.

As tulipas são plantas monocotiledôneas da família *Liliaceae* que tem como centro de origem a cadeia de montanhas Pamir Alai e Tien Shan, na Ásia Central (HOOG, 1973). Foram introduzidas na Holanda, por volta de 1594, sendo atualmente o maior produtor da planta no mundo. As tulipas foram cultivadas por longo tempo, resultando em grande diversidade de formas de flores, crescimento, vigor e floração, sem determinação de espécies. Essas, são chamadas de *Tulipa gesteriana* L. que é a espécie de maior comercialização atual (VAN TUYL & VAN CREIJ, 2006).

São cultivadas com a finalidade de produção de bulbos, flores de corte ou envazadas e para fins paisagísticos. Além da finalidade ornamental, as tulipas tinham outras finalidades, sendo elas medicinal e alimentícia. Durante a ocupação nazista, as holandesas comiam flores de tulipa e seus bulbos, devido à falta de alimentos. Esses propágulos eram considerados interruptivos do ciclo menstrual. As pétalas possuem sabor adocicado e dependendo da variedade, o sabor remete a alface ou ervilhas, podendo ser utilizadas em saladas ou sanduíches. De modo empírico, as pétalas eram utilizadas como cataplasma para aliviar vermelhidão na face e em cortes, calos, calosidades e picadas de insetos. Poucos estudos têm sido realizados para a investigação de compostos bioativos presentes nas pétalas de tulipa e seus benefícios (VAN TUYL & VAN CREIJ, 2006; BUSSI, 2018).

Sagdic *et al.* (2013), afirmam que devido à presença de antocianina, ocorrem efeitos bioativos e citotóxicos. Colocam também que os corantes obtidos das flores vermelhas, cor-de-rosa e violeta possuem potencial para utilização como corantes alternativos nas indústrias alimentares e farmacológicas.

Van Tuyl & Van Creij (2006) afirmam que muitas doenças afetam as plantas de tulipas, como a podridão do bulbo e doenças virais, causando grandes danos econômicos. Para prevenção de tais doenças, a melhor abordagem se dá, por meio de resistência dos hospedeiros. O uso de bulbos resistentes favorece ao menor uso de defensivos químicos, reduz a mão-de-obra para a seleção de bulbos e ocasiona a maior produção.

Tais plantas podem ser afetadas pela Podridão Mole, que tem como agente a bactéria pectinolítica *Pectobacterium carotovorum*, capaz de causar a perda total do cultivo trazendo prejuízos econômicos. Como não há tratamento conhecido é de importância significativa que se mantenha o controle fitossanitário dos bulbos, rizomas e/ou tubérculos, seja para fins de importação, exportação e/ou mercado interno, devido à sua forma de armazenamento.

4.7. Bactérias Fitopatogênicas

Ligados a fitopatologia, que é a ciência que estuda doenças de origem vegetal, os fitopatógenos são organismos que causam doenças infecciosas em plantas. O hospedeiro e o patógeno, em relação com o ambiente mutuamente se influenciam, resultando em modificações histológicas, fisiológicas e morfológicas.

Entre os fitopatógenos, as bactérias possuem grande importância, devido a sua alta incidência e grande severidade em culturas de elevado valor econômico. Além disso, a facilidade de disseminação dificulta o controle para as doenças por elas causadas.

As bactérias são organismos procariontes microscópios, com uma única célula e possuem parede celular. Diferente dos organismos superiores, não possuem núcleo verdadeiro e seu material genético é localizado no citoplasma da célula, sendo um DNA circular de fita simples. Estas são distribuídas em vários gêneros e espécies, separadas por características bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e moleculares. Possuem formatos de bastonetes ou bacilos, mas podem apresentar outras formas. Algumas apresentam flagelos, tornando-as móveis e, de acordo com a quantidade desses filamentos contrácteis, as bactérias podem ser classificadas em: átricas, quando não há presença; monótricas, quando possuem um filamento em posição polar ou lateral; lofótricas, quando ocorre tufo de flagelos em posição polar e perítricas, quando possuem flagelos em toda sua volta (ALMEIDA, 2006).

A composição química da parede celular faz com que se possa diferenciar as bactérias, juntamente com o teste de Gram, em Gram-positivas ou Gram-negativas. Enquanto em um grupo de bactérias a parede celular é rica em peptidoglican, no outro grupamento ocorre em pequenas concentrações, sendo mais permeável. Essa substância é presente em todas as paredes celulares das bactérias, conferindo rigidez. Sendo assim, a menos permeável é chamada de Gram negativa, tendo mais facilidade em remover o corante durante a coloração, quando utilizado o álcool em uma das etapas. Já as bactérias Gram positivas, possuem a parede celular mais permeável e o álcool não consegue descolori-las, mantendo a coloração inicial (Bergamin Filho *et al.*, 1995).

Com o grande aumento do mercado de plantas ornamentais, muitos fitopatógenos já foram descritos, causando injúrias a essas plantas em diferentes partes do mundo. No Brasil, nem todos os patógenos presentes em diversas culturas ainda não foram relacionados a espécies ornamentais, porém, ressalta-se que, bactérias, em especial, possuem grande potencial de oferecer riscos a outros hospedeiros, além dessas plantas (ALMEIDA, 2006).

4.7.1. Bactérias pectinolíticas

São chamadas de pectobactérias, as bactérias que em seu hospedeiro suscetível, produzem uma grande quantidade de enzimas pectinolíticas, capazes de degradar tecidos parenquimatosos, principalmente em dicotiledôneas de ciclo curto e anual, pois possuem pouca lignina em seus tecidos. Sua penetração no tecido vegetal é feita por meio de aberturas naturais, como estômatos, ferimentos causados por tratamentos culturais, por insetos, ou até mesmo pelo atrito

entre as plantas. Após a penetração, o patógeno causa Podridão mole, onde o sintoma inicial é uma pequena lesão encharcada, ocorrendo o alargamento da lesão rapidamente, tornando-se descolorada ou acinzentada. Os tecidos ficam com coloração podre, desintegrando-se em uma massa de células da planta e das bactérias. Os tecidos são convertidos em uma massa aquosa de células desorganizadas, no prazo de três a cinco dias. Esses tecidos infectados, geralmente liberam um odor fétido que é produzido por uma segunda bactéria, onde se desenvolveu através do ambiente favorável ao seu crescimento (HAYWARD & MARIANO, 1997; EMBRAPA, 2008; KADO, 2010; FELIX *et al.*, 2016).

Bactérias pectinolíticas foram inicialmente chamadas de *Erwinia*, sendo proposto para agrupar as bactérias Gram negativas, não formadoras de esporos, peritríquias, fermentativas, com formato de bastonetes, da família Pectobacteriaceae, contendo os gêneros *Pectobacterium* (Hauben *et al.*, 1998), *Brenneria* (Brady *et al.*, 2014), *Dickeya* (Samson *et al.*, 2005), *Lonsdalea* (Brady *et al.*, 2012), *Musicola* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2021), *Sodalis* (Dale & Maudlin, 1999) e *Symbiopectobacterium* (Nadal-Jimenez *et al.*, 2022) (ADELOU *et al.*, 2016).

As pectobactérias possuem a seguinte posição taxonômica

Domínio: *Bactéria*

Filo: *Proteobacteria*

Classe: *Gammaproteobacteria*

Ordem: *Enterobacteriales*

Família: *Pectobacteriaceae*

4.7.1.1. *Pectobacterium* spp.

Pectobacterium, conhecida como bactéria da podridão mole, é uma bactéria anaeróbica facultativa, Gram negativa e móvel por flagelos peritríquios. Possui ótimo crescimento em temperaturas de 28°C a 30°C. Suas colônias em nutriente ágar possuem coloração creme, são circulares, lisas, brilhantes, visíveis a olho nu e crescem em 24 horas quando incubadas a temperaturas de 25°C a 30°C (Bergamin Filho, *et al.* 1995; MARIANO *et al.*, 2005).

Sua característica principal é a produção enzimática pectinolítica, que por sua vez, é responsável pela maceração de tecidos vegetais, degradando a lamela média das células, provocando o aspecto de podridão nas plantas. Sua ocorrência em campos de produção vegetal pode causar grandes danos em pós-colheita, porém o nível de severidade da bactéria é relativo ao clima e condições de estocagem do produto (Embrapa, 2008).

As espécies de *Pectobacterium* são: *Pectobacterium carotovorum* (Portier *et al.*, 2019); *Pectobacterium actinidiae* (Portier *et al.*, 2019); *Pectobacterium aquaticum* (Pédrón *et al.*, 2019), *Pectobacterium aroidearum* (Nebhan *et al.*, 2013), *Pectobacterium artrosepticum* (Gardan *et al.*, 2003), *Pectobacterium betavascularum* (Gardan *et al.*, 2003), *Pectobacterium brasiliense* (Portier *et al.*, 2019), *Pectobacterium cacticidum* (Hauben *et al.*, 1999), *Pectobacterium carnegiana* (Hauben *et al.*, 1991), *Pectobacterium chrysanthemi* (Hauben *et al.*, 1998), *Pectobacterium cypripedii* (Hauben *et al.*, 1998), *Pectobacterium fontis* (Oulghazi *et al.*, 2019), *Pectobacterium maceratum* (Shirshikov *et al.*, 2018), *Pectobacterium odoriferum* (Portier *et al.*, 2019), *Pectobacterium parmentieri* (Khayati *et al.*, 2016), *Pectobacterium parvum* (Pasanen *et al.*, 2020), *Pectobacterium peruvienne* (Waleron *et al.*, 2022), *Pectobacterium polaris* (Dees *et al.*, 2017), *Pectobacterium polonicum* (Waleron *et al.*, 2019), *Pectobacterium punjabense* (Sarfranz *et al.*, 2018), *Pectobacterium quasiquaticum* (Ben Moussa *et al.*, 2021), *Pectobacterium rhapontici* (Hauben *et al.*, 1998), *Pectobacterium versatile* (Portier *et al.*, 2019), *Pectobacterium wasabiae* (Gardan *et al.*, 2003).

Possui formas de controle que são consideradas difíceis. A capacidade da bactéria sobreviver em restos culturais que foram infectados, na água, no solo, na rizosfera de plantas invasoras e até mesmo das cultivadas é muito grande. Porém, ela conta com um ambiente

favorável, como temperatura e umidade, para o desenvolvimento ou retardamento da doença (KIKUMOTO, 1980; PÉROMBELON & KELMAN, 1980).

4.7.1.2. *Dickeya* spp.

Dickeya spp. são bactérias pectinolíticas que pertencem a família *Pectobacteriaceae*, caracterizadas pela grande produção de enzimas pectinolíticas extracelulares. Gram negativas, possuem motilidade por flagelos peritríquios, não formadoras de esporos e anaeróbias facultativas. Possuem células com formato de bastonetes, variando de 0,5 a 3,0 µm, com as extremidades arredondadas, podendo estar isoladas ou em cadeia (SAMSON *et al.*, 2005).

As espécies de *Dickeya* são: *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953), *Dickeya aquática* (Parkinson *et al.*, 2014), *Dickeya dianthicola* (Samson *et al.*, 2005), *Dickeya dieffenbachiae* (Samson *et al.*, 2005), *Dickeya fangzhongdai* (Tian *et al.*, 2016), *Dickeya lacustis* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2019), *Dickeya oryzae* (Wang *et al.* 2020), *Dickeya paradisiaca* (Samson *et al.*, 2005), *Dickeya parazeae* (Hugouvieux-Cotte-Pattat & Van Gijsegem, 2021), *Dickeya poaceiphila* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2020), *Dickeya solani* (van der Wolf *et al.*, 2014), *Dickeya undicola* (Oulghazi *et al.*, 2014), *Dickeya zae* (Samson *et al.*, 2005).

Semelhantes a *Pectobacterium carotovorum* e muitas vezes confundidas entre si, em meio de cultura, produzem coloração amarelada em meio de cultura BDA e crescimento a 36°C (SILVA, 2012; CARDOZA, 2015).

4.7.1.3. *Brenneria* spp.

A *Brenneria* spp. tem sua temperatura ótima para o desenvolvimento em meios de cultura de 30°C a 33°C. Dentro desta faixa e com o oxigênio, a bactéria produz uma colônia de cor creme a branca. O gênero foi descrito em 1998 (HAUBEN *et al.*, 1998), agrupando seis espécies de bactérias que anteriormente faziam parte do gênero *Erwinia*. As seis espécies são: *Brenneria salicis* (Day, 1924), *Brenneria alni* (Surico *et al.*, 1996), *Brenneria corticis* (Li *et al.*, 2019), *Brenneria goodwinii* (Denman *et al.*, 2012), *Brenneria nigrifluens* (Hauben *et al.*, 1999), *Brenneria paradisiaca* (Hauben *et al.*, 1999), *Brenneria Populi* (Zheng *et al.*, 2017), *Brenneria quercina* (Hauben *et al.*, 1999), *Brenneria rosaea* (Brady *et al.*, 2015), *Brenneria rubrifaciens* (Hauben *et al.*, 1999), . A bactéria se propaga pelo córtex e pelo floema, afetando o transporte de nutrientes (ANGUIANO *et al.*, 2016).

4.7.1.4. *Lonsdalea* spp.

Lonsdalea spp. são bactérias que desenvolvem sintomas isolados de cancrios bacterianos em hospedeiros lenhosos, como carvalho, álamo e salgueiro. Possuem células Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, com formato de bastonetes curtos móveis que aparecem isoladamente ou em pares. As espécies são mesófilas, favorecendo temperaturas de crescimento de 28°C a 34°C. O gênero *Lonsdalea* agrupa quatro espécies: *Lonsdalea quercina* (Li *et al.*, 2017), *Lonsdalea britannica* (Li *et al.*, 2017), *Lonsdalea ibérica* (Li *et al.*, 2017) e *Lonsdalea Populi* (Li *et al.*, 2017) (BRADY *et al.*, 2015).

4.7.1.5. *Musicola* spp.

O gênero *Musicola* é formado por bactérias pectinolíticas gram-negativas, não esporuladas e anaeróbicas facultativas. São móveis com presença de flagelos peritríquios. Em meio de cultura LB, formam colônias de 0,5-2,5 mm de diâmetro com aparência translúcida em 48h a 30°C. A temperatura ideal para essas bactérias é de 25-36°C e podem crescer até 40-41°C. Elas produzem pectinases extracelulares, uma celulase, mas não proteases. O gênero possui as espécies *Musicola paradisiaca* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2021) e *Musicola keenii* (Hugouvieux-Cotte-Patta *et al.*, 2021).

4.7.1.6. *Sodalis* spp.

As células são não móveis, não formadoras de esporos, filamentosas, bastonetes Gram-negativos (2–12 µm de comprimento, 1–1,5 µm de diâmetro), dividindo-se por septação. A temperatura ótima para o crescimento é de 25°C com pouco ou nenhum crescimento em temperaturas superiores a 30°C. O gênero conta com as espécies: *Sodalis glossinidius* (Dale & Maudlin, 1999), *Sodalis melophagi* (Chrudimský *et al.*, 2012), *Sodalis pierantonius* (Oakeson *et al.*, 2014) e *Sodalis praecaptivus* (Chari *et al.*, 2015) (DALE & MAUDLIN, 1999).

4.7.1.7. *Biostraticola* spp.

Bactéria Gram-negativa, imóvel sem flagelos, não formadora de esporos, possuindo formato de bastonete. É anaeróbica facultativa e fermenta uma ampla gama de carboidratos. Tem crescimento ideal de 25°C a 30°C, porém cresce na faixa de 5°C a 30°C, não possuindo crescimento a 35°C. As células possuem tamanho médio de cerca de 1 a 1,3 × 3 a 4 µm e crescimento entre pH 5,0 e 9,2, sendo o ótimo entre 8,2 e 9,2. Possui a espécie *Biostraticola tofi* (Verborg *et al.*, 2008).

4.7.1.8. *Acerihabitans* spp.

Bactéria Gram-negativa, facultativamente anaeróbica, podendo ser extraída de seiva. Possuem células não esporulantes, móveis, com formato de bastonetes curtos demonstrando crescimento de 4°C a 37°C, pH 6,0 a 8,0 e 0 a 4% NaCl. Pertence à família Pectobacteriaceae e formou um gênero distinto entre os membros dos gêneros *Sodalis* e *Biostraticola*. A espécie pertencente ao gênero é a *Acerihabitans arboris* (Lee *et al.*, 2021)

No Brasil, as bactérias pectinolíticas foram identificadas em diversos estados, causando danos a muitas culturas. Em Minas Gerais, Tebaldi & Mota (2014) observaram em pseudocaulis de *Musa* spp. sintomas de murcha de folhas, seguida de seca e podridão mole, causada por *Pectobacterium carotovorum*.

No estado do Rio Grande do Sul, El Tassa (2004) coletou tubérculos de *Solanum tuberosum* que mostravam sintomas de podridão mole na pós-colheita. Foi identificada a bactéria *Pectobacterium carotovorum*, sendo concluído que as batatas-semente carregavam de forma latente a bactéria, contribuindo para a grande incidência de podridão mole.

Carmo (2021) também observou sintomas de podridão mole em *Lactuca sativa* em casa de vegetação da Universidade Federal de Uberlândia, no Estado de Minas Gerais, identificando *Pectobacterium carotovorum* nas plantas de alface. Assim como Queiroz *et al.* (2017), que identificaram *Pectobacterium* spp., causando sintomas de podridão mole em plantas de couve, no município de Juazeiro, Bahia.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção e caracterização de isolados bacterianos, causadoras de podridão mole

Os ensaios foram realizados nos anos de 2020, 2021 e 2022 no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.), localizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

Bulbos de plantas ornamentais (Lírios, Zantedeschias e Tulipas), são regularmente recebidos para análise fitossanitária no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, com origem de diversos países. Desses propágulos, foram separados os que apresentavam sintomas de podridão mole, com forte odor fétido, contendo possíveis contaminações por *Pectobacterium* (Figura 1), de diferentes lotes e cultivares, e armazenados em câmara fria para possível identificação, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Isolados e origem de amostras de *Zantedeschia aethiopica* infectadas com bactéria.

Sigla	Hospedeiro	Cultivar	Material Propagativo	Origem
CO	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	‘Captain Odeon’	Bulbo	Holanda
RP	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	‘Royal Princess’	Bulbo	Holanda
SC	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	‘Sun Club’	Bulbo	Holanda
SS	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	‘Summer Sun’	Bulbo	Holanda



Figura 2. Bulbo de *Zantedeschia aethiopica* com sintoma de podridão mole

A partir dessas informações, foi utilizado o método de isca biológica, onde os tecidos com características da doença foram coletados por meio de palitos de madeira esterilizados, encostando nas lesões - que não são encontradas em tecidos saudáveis - com sintomas de podridão bacteriana. Adaptando a metodologia de Mariano *et al.* (2005), baseada em Takatsu *et al.* (1981), os mesmos palitos foram introduzidos em tubérculos de batata previamente desinfestados com hipoclorito a 25% e lavados com água destilada e esterilizada. As batatas foram incubadas em câmara úmida a 28°C, por 24 a 48 horas. Após o período de incubação, as batatas inoculadas com as lesões de RP e CO obtiveram resposta positiva para bactéria pectinolítica (Figura 2). Já as batatas inoculadas com SC e SS não obtiveram resposta positiva a degradação de pectina sendo descartadas.



Figura 3. *Solanum tuberosum* após inoculação com o isolado CO

Das amostras positivas foi retirado uma porção no tecido com características de podridão mole que foram inoculados pelo palito com o auxílio de uma alça de platina, suspendendo em água destilada e esterilizada.

A partir da suspensão obtida, com o auxílio de uma alça de *Drigalski*, o microrganismo foi isolado em meio 523 de Kado & Heskett (1970), mantido por 24 a 48 horas em estufa com temperatura de aproximadamente 28°C, obtendo-se colônias isoladas do microrganismo (Figura 3), com coloração creme, com bordos irregulares, côncavas, e rápido crescimento em meio de cultura, e segundo Santos *et al.* (2020), de acordo com Romeiro (2001) e Hélias *et al.* (2012) são características de *Pectobacterium*.

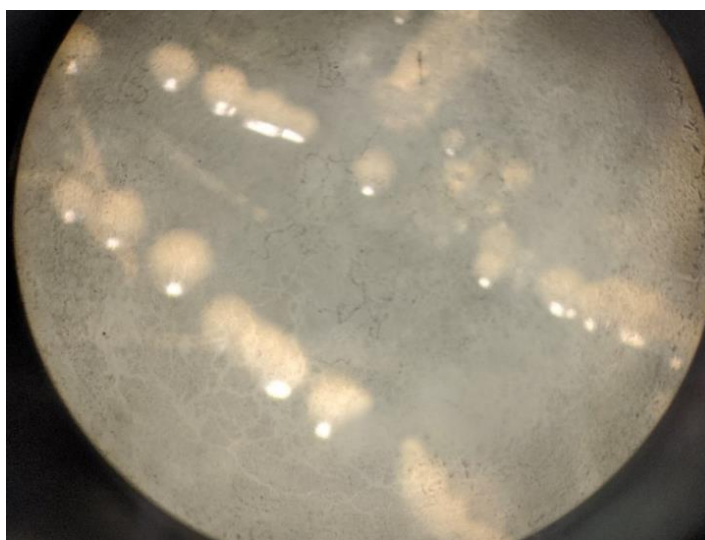


Figura 4. Colônias de *Pectobacterium* observadas em Microscópio Estereoscópio Binocular Wild (120x)

As colônias isoladas foram repicadas para o meio de cultura 523 de Kado & Heskett (1970), por 24 a 48 horas, e mantidas em estufa bacteriológica DE LEO, com temperatura de 28°C \pm 1°C, a fim de se obter a cultura pura do microrganismo.

Para se confirmar a atividade pectinolítica da bactéria em cultura pura, foi feita suspensão de células bacterianas em água destilada e esterilizada seguido de inoculação em

tubérculo de batata sadio (previamente desinfestado com hipoclorito de sódio a 25%, lavado com água destilada e esterilizada e, seco com papel toalha), com o auxílio de um palito esterilizado e embebido na suspensão bacteriana. O tubérculo foi levado a câmara úmida com temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 a 48 horas. Quando inoculado em tecidos saudáveis, o microrganismo deve causar a doença associada a ele, reproduzindo os sintomas iniciais, completando as etapas do Postulado de Koch.

Os postulados são um conjunto de regras seguidas quando se faz o estudo de doenças infecciosas, fornecendo base experimental para tal, sendo um conceito básico em bacteriologia. Ou seja, o objetivo dos Postulados de Koch são de isolar um microrganismo para cultivá-lo em meio de cultura, provando seus efeitos infecciosos, por meio de testes em tecidos saudáveis (MÜNCH, 2003).

5.2. Coloração de Gram

Um dos métodos para a identificação de bactérias é por meio da coloração de Gram. Por esse teste, é possível a diferenciação de Gram-positivas e Gram-negativas, devido a permeabilidade da parede celular. A substância peptidoglican, responsável pela rigidez das células, são encontradas em concentrações diferentes em bactérias. As Gram-negativas possuem parede celular mais permeável, ou seja, menor quantidade de peptidoglican, fazendo com que se obtenha coloração rosada. As Gram-positivas possuem maior rigidez na parede celular, obtendo uma coloração roxa (MICHEREFF, 2016). O procedimento foi feito no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.), de acordo com o procedimento operacional padrão do local. Inicialmente foi feito o esfregaço da cultura bacteriana em fluxo laminar, respeitando as normas e condições de assepsia. Em uma lâmina de microscopia, foi aplicado uma gota de água destilada e esterilizada. No meio de cultura 523, foram coletadas colônias da cultura pura e adicionado na água aplicada na lâmina anteriormente, dissolvendo-as. O esfregaço foi seco em temperatura ambiente e após, com o auxílio da lamparina, fixado na lâmina.

Após a fixação, o esfregaço foi coberto com cristal violeta por 60 segundos e logo após foi lavado com água corrente. Na sequência, a lâmina foi coberta com lugol por 60 segundos e novamente foi lavada com água corrente. Seguindo, o esfregaço foi coberto com álcool por 10 a 20 segundos, sendo no fim, lavado com água corrente e coberto por Safranina em 60 segundos e novamente lavado em água corrente. A lâmina foi seca em temperatura ambiente e após, foi observado em Microscópio Ótico Olympus CX 40, no aumento de 1000x.

5.3. Sensibilidade a Solução Salina

Para fim de diferenciação da bactéria pectinolítica entre *Dickeya sp.* e *Pectobacterium sp.*, foi feito o teste de sensibilidade a solução salina. As bactérias foram inoculadas em Caldo Nutriente enriquecidas com concentrações de 1% e 5% de NaCl em tubos de ensaio e incubadas em estufa bacteriológica a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Após, observou-se a turbidez dos tubos inoculados.

5.4. Caracterização Molecular

A extração do DNA das culturas puras dos isolados bacterianos obtidos, foi feita com o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN BRASIL), conforme instruções do fabricante. Com o DNA extraído foi realizado o teste de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), onde utilizou-se os primers Df (5'-AGAGTCAAAGCGTCTTG-3'), Dr (5'-TTTACCCACCGTCAGTC-3'), para a detecção de *Dickeya sp.*; Y45 (5'-TCACCGGACGCCGAAGTGTGGCGT-3') e Y46 (5'-TCGCCAACGTTTCAGCAGAACAAGT-3'), para detecção geral de bactérias; ExpccF (5'-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3') e Expccr (5'-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3') para a detecção de *Pectobacterium carotovorum*

além do *Kit Platinum PCR SuperMix High Fidelity* (Thermo Fisher), segundo instruções do fabricante. Para a amplificação do fragmento de DNA no termociclador PTC-200 (MJ Research) foram utilizados os ciclos: pré-desnaturação a 95°C por quatro minutos; 30 ciclos seguidos de 94°C de desnaturação inicial por 45 segundos, anelamento a 62°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos; seguido de um ciclo final de extensão final de 72°C por cinco minutos, 4°C por cinco minutos. Ao todo, o processo durou 2 horas, 49 minutos e 50 segundos.

Os *amplicons* foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,0 % em tampão TAE 1x contendo brometo de etídio 10 mg/mL. Foram aplicados 18 µL do produto de PCR das amostras nas canaletas do gel e submetido à corrente elétrica de 88 volts por 20 minutos. Os *amplicons* foram visualizados em luz ultravioleta para a análise da massa molecular.

5.5. Teste de resistência em bulbos de *Zantedeschias*, Tulipas e Lírios

Para determinar a resistência utilizou-se bulbos de *Lilium pumilum*, cultivares Albufeira, Breakout, Brindis, Corleone, Dalian, Dynamix, El Divo, Honesty, Litouwen, McCarran, Menton, Merlet, Metropolitan, Nachville, Nenzi, Pavia, Pokerface, Rodengom Tiny Bee, Tiny Invader, Tiny Pearl, Yerseke; bulbos de *Lilium speciosum*, cultivares Asterian, Bacardi, Bellville, Castelani, El Doret, Firebolt, Joop, La Mancha, Maldano, Monteneum Nova Zembla, Paradero, Refdord, Roselily Angela, Roselily Ciara, Roselily Elena, Roselily Mônica, Santander, Sibéria, Siponto, Sisto, Sorbonne, Starlight Express, Sunny Keys, Sunny Martinique, Sunny Robyn, Tabledance, Tarrango, Touchstone, Vetto, Yelloween, Zanbezi, Zelmira; bulbos de *Tulipa gesneriana*, cultivares Barcelona, Ile de France, Leen Van Der Mark, Pallada, Royal Virgin, Snowboard, Strong Gold, White Prince; bulbos *Zantedeschia aethiopica*, cultivares Allure, Captain Morelli, Captain Odeon, Captain Promise, Captain Romance, Captain Trinity, Captain Ventura, Golden Medal, Le Reve, Odessa, Orania, Outback, Paco, Passoa, Royal Princess, Royal Valentine, Summer Sun, Sun Club e Zazu, recebidos no L.O.D.F. para a análise. Como controle positivo da atividade pectinolítica do isolado bacteriano foi usado tubérculo de batata inoculado com o isolado bacteriano a ser testado.

Foram utilizados três bulbos de cada cultivar para cada isolado, onde foram desinfestados com água destilada, Hipoclorito de sódio (NaClO) a 25% e água destilada estéril por 15 minutos cada conforme descrito por Ni *et al.* (2010). Após a desinfestação, os bulbos foram colocados em uma bandeja com papel toalha para secagem, por uma noite, a fim de obter uma superfície seca para a inoculação da suspensão bacteriana.

Mariano *et al.* (2005) utilizaram uma metodologia baseada em Takatsu *et al.* (1981) ao inocular *Pectobacterium carotovorum*, onde foram utilizados palitos esterilizados para se obter ferimentos em pimentões. Utilizando a mesma metodologia, foram utilizados palitos semelhantes nos bulbos de lírios, *Zantedeschias* e tulipas a fim de se inocular com uma suspensão pré-estabelecida de pectobactérias.

Os bulbos, foram inoculados com uma alíquota de 500 µL de uma solução bacteriana (8×10^7 a 8×10^8 UFC/mL) em cada um deles, com o auxílio de uma micropipeta automática P1000. Inicialmente, os propágulos foram inseridos em frascos de cultura, juntamente com algodão embebido em água destilada estéril para obtenção de câmara úmida. Os frascos são de vidros transparentes, com capacidade de 225 mL e tampa rosqueável (Figura 4).



Figura 5. Frascos de vidro transparente, com capacidade de 225 mL, utilizados como câmara úmida para o teste de resistência em bulbos.

Os bulbos foram identificados com o nome da cultivar e qual isolado foi utilizado para inoculá-los. A câmara úmida foi mantida por 48 horas, com a temperatura variando de acordo com o Isolado utilizado. Para o isolado ‘Captain Odeon’ (CO), utilizou-se a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e para o isolado ‘Royal Princess’, $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para evitar variação de temperatura e afetar o crescimento das colônias, foram utilizadas estufas B.O.D. (Figura 5), para manter a temperatura adequada para o desenvolvimento do microrganismo



Figura 6. Estufa B.O.D. FANEM, com câmaras úmidas feitas em frascos de vidro contendo bulbos inoculados e chumaço de algodão embebido em água destilada e deionizada estéril.

5.6. Isolamento bacteriano através de Plantas de *Zantedeschia* naturalmente infectadas e de plantas parasitas e invasoras associadas

Bulbos de plantas ornamentais com sintomas iniciais de podridão mole foram plantados em vasos com turfa, na estufa do Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, na UFRRJ (Figura 6).



Figura 7. Cultivo de plantas ornamentais em vasos de plástico com uso de turfa, na estufa do Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.)

Algumas plantas, com características de podridão mole, foram levadas para o Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, desinfestadas e colocadas em água destilada estéril, obtendo uma suspensão bacteriana. Inicialmente a suspensão foi inoculada em um tubérculo de batata, a fim de confirmar a ação pectinolítica da bactéria em questão. O tubérculo de batata foi mantido em câmara úmida, a fim de criar o ambiente perfeito para o desenvolvimento do inóculo e logo após, isolado em meio 523 de Kado & Heskett (1970) conforme assinalado no item 5.1.

5.6.1. Teste de recuperação da bactéria por meio de suspensão rizosférica.

Foram coletadas nos vasos com solos contaminados com *Pectobacterium carotovorum*, plantas de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. ex Wight (Falsa serralha) (Figura 7A) e *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Quebra-pedra) (Figura 7B), colocadas em placas de Petri esterilizadas e levadas ao Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário.

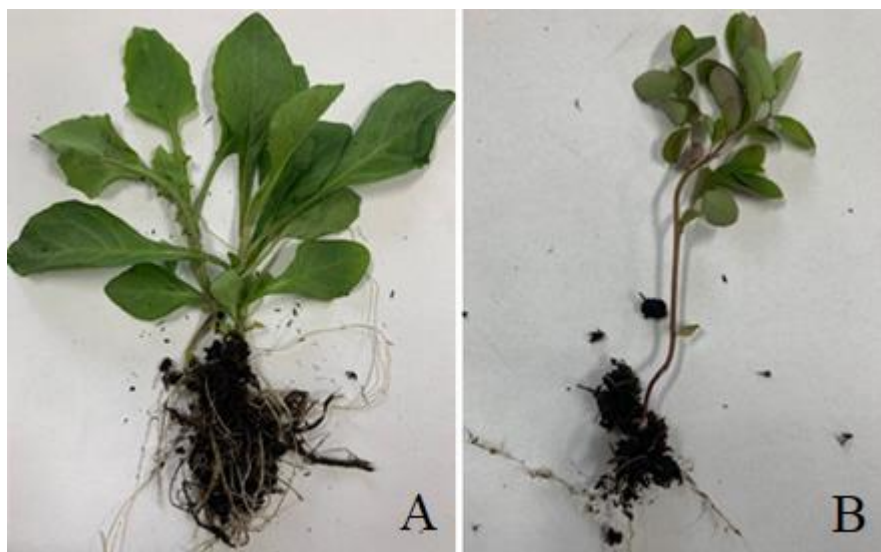


Figura 8. Plantas daninhas encontradas nos vasos de plantas ornamentais com solo contaminado. A) *Emilia sonchifolia* (L.) DC. ex Wight (Falsa serralha). B) *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Quebra-pedra)

Conforme Melo (1999), as plantas foram retiradas das placas e com pinça estéril foram removidos os torrões de solo, deixando apenas 1 cm do solo encontrado ao redor da raiz. As raízes foram removidas com o auxílio da pinça e levadas a outras placas durante alguns minutos, a fim de ocorrer uma breve secagem no solo ali encontrado. Em seguida, foram desinfestadas com água destilada estéril e hipoclorito de sódio a 25% por 20 segundos, cada. Para obter uma suspensão bacteriana, foi adicionada água destilada esterilizada, formando assim uma suspensão de microrganismos encontrados na rizosfera. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, a suspensão foi isolada em meio de cultura 523 de Kado & Heskett (1970) e incubadas em estufa bacteriológica a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 horas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Obtenção e caracterização de isolados bacterianos, causadoras de podridão mole

Os bulbos *Zantedeschia* sp., analisados no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.) com sintomas de podridão mole foram submetidos ao teste de isca biológica para que ocorresse a confirmação de que se tratava de bactérias pectinolíticas. Após o teste, foi possível verificar que os isolados de *Zantedeschia* sp. das cultivares Royal Princess e Captain Odeon obtiveram resultado positivo para bactérias pectinolíticas e as cultivares Sun Club e Summer Sun tiveram respostas negativas (Tabela 2).

Tabela 2: Resultado do teste de isca biológica a partir da inoculação com cultura pura de isolado bacteriano em meio de cultura 523.

Local	Cultivares de <i>Zantedeschia aethiopica</i>	Meio de cultura	Pectinolítica
L.O.D.F.	Royal Princess	523	Positivo
L.O.D.F.	Capt. Odeon	523	Positivo
L.O.D.F.	Sun Club	-	Negativo
L.O.D.F.	Summer Sun	-	Negativo

Os bulbos separados a fim de serem submetidos ao método de isolamento bacteriano, por meio da metodologia descrita por Mariano *et al.* (2005), baseada em Takatsu *et al.* (1981), onde, para isolar *Pectobacterium carotovorum*, os pesquisadores utilizaram frutos de pimentão como isca biológica, porém, utilizou-se tubérculos de *Solanum tuberosum*, por ser de mais fácil o manuseio. Após o procedimento, os frutos foram mantidos em câmara úmida, dando-se início as etapas do postulado de Koch, para provar os efeitos infecciosos dos microrganismos coletados, como descreveu Pires (2017).

O isolamento da bactéria, ocorreu em meio 523, sendo incubado por 48 horas com as temperaturas de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 48 horas encontrou-se nas placas, colônias com características morfológicas da bactéria em questão, como mostra a Figura 8A.

6.2. Coloração de Gram

O teste de Gram mostrou células em grande quantidade, com formatos de bastonetes, possuindo coloração avermelhada, indicando o resultado do teste como Gram negativa, como mostra a Figura 8B.

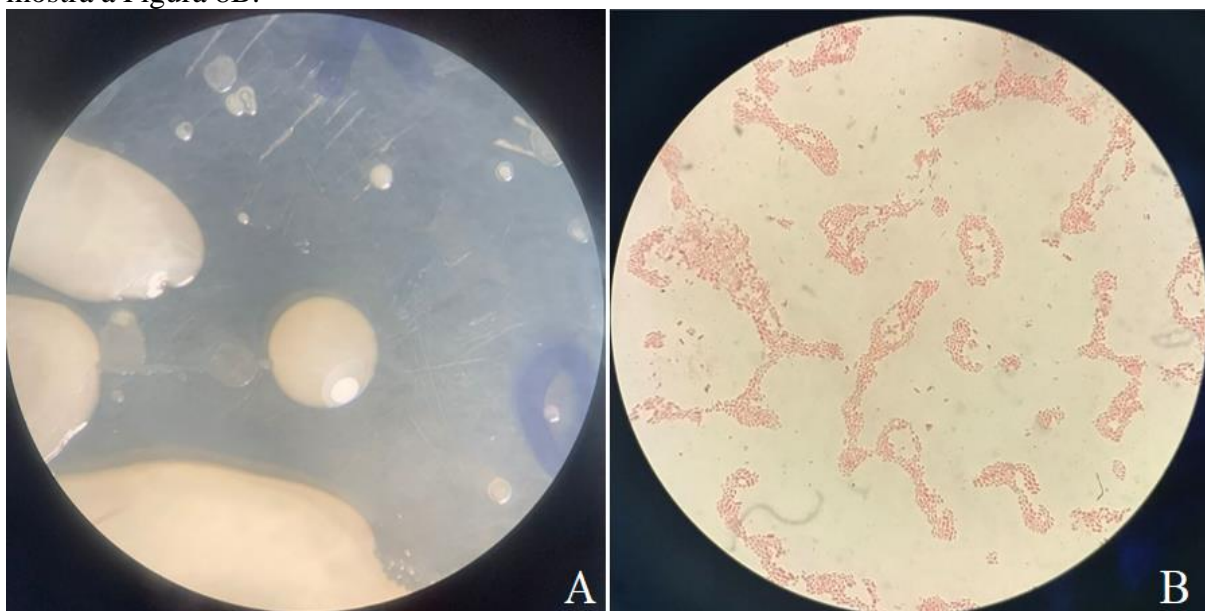


Figura 9. Aspectos morfológicos de isolado bacteriano em Microscópio: A) Colonias de *Pectobacterium* observadas em Microscópio Estereoscópio Binocular Wild no aumento 250X após 48 horas em temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. B) Teste de Gram observado em Microscópio Ótico Olympus CX 40, no aumento de 1000x.

Ao observar em microscópio uma suspensão do mesmo isolado, notou-se células em formato de bastonetes e com motilidade em várias direções, sendo classificada como peritríquia. As características morfológicas, como coloração, formato da colônia, motilidade, comportamento nos vegetais, formato das células e ótimo desenvolvimento em temperaturas de 25°C a $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ indicam que o isolado é *Pectobacterium carotovorum*, como identificados por Silva (2012) e por De Boer e Kelman (2001), onde os isolados testados por eles, possuíam colônias com formato circular, eram lisas, convexas, com diâmetro que variava de 1 a 3 mm, brilhosa, cor creme palha e Gram negativas.

6.3. Sensibilidade a Solução Salina

No teste de sensibilidade a solução salina, as bactérias foram inoculadas em Caldo Nutriente enriquecidas com três concentrações de NaCl. Após as 24 horas incubadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, observou-se que ocorreu turbidez (Figura 9) em todos os tubos enriquecidos com Cloreto

de Sódio. Sendo assim, confirma-se que a bactéria em questão é uma *Pectobacterium* sp., pois ela não é sensível a soluções salinas, podendo ser descartada a opção de a bactéria ser uma *Dickeya* sp., como informado pelo NCP, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (2017).

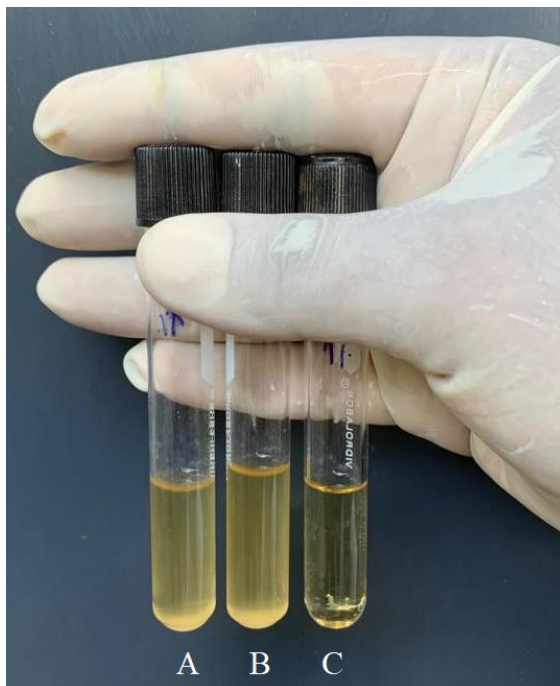


Figura 10. Teste de sensibilidade a NaCl. A) Caldo Nutriente inoculado, enriquecido com NaCl a 1%. B) Caldo Nutriente inoculado, enriquecido com NaCl a 5%. C) Caldo Nutriente com Controle Branco.

Durante os ensaios, notou-se que os isolados RP e CO se comportavam de formas diferentes, de acordo com a temperatura utilizada. Sendo que o isolado RP se desenvolveu melhor em temperaturas próximas a 28 ± 1 °C e o isolado CO obteve melhor desenvolvimento em temperaturas próximas a 26 ± 1 °C. Porém, ambos os isolados obtiveram crescimento em 37°C. Alvarado (2006) afirma que, as *Pectobacterium carotovorum* que crescem em 37°C são da subespécie *carotovorum*. Em conjunto com as características já citadas, confirma-se como *Pectobacterium carotovorum*.

6.4. Caracterização Molecular

Silva (2012) afirma que, por mais que testes fisiológicos e bioquímicos deem positivos, há uma grande diversidade em espécies de *Pectobacterium*, tornando difícil a identificação apenas por esses parâmetros. Devido a isso, utiliza-se o teste molecular. O teste foi feito no L.O.D.F. onde foram feitas as extrações do DNA e o Teste de PCR, utilizando os iniciadores Expccf e Expccr; e Y45 e Y46, onde foi obtido o fragmento esperado de 550 pares de bases para os isolados RP e CO. sendo resultado positivo para *Pectobacterium carotovorum*, considerado ótimas opções para a identificação do patógeno (Figuras 10A e 10B).

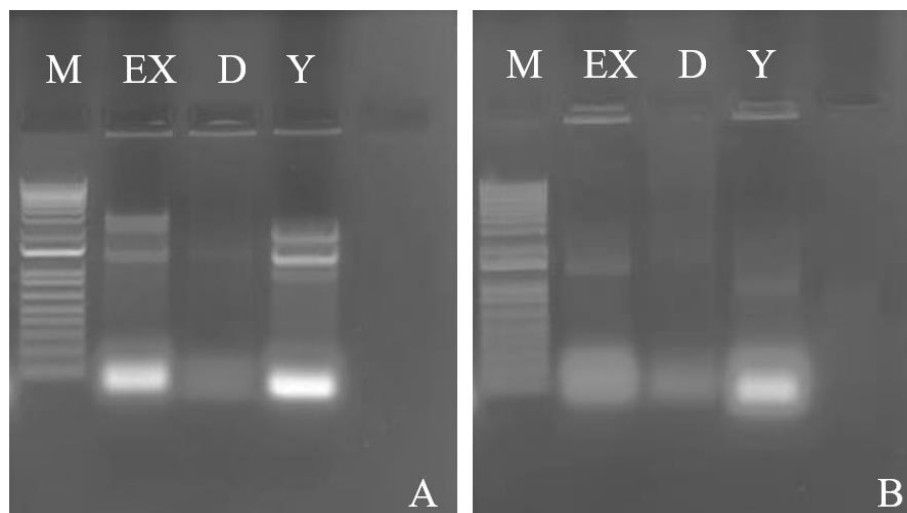


Figura 11. *Pectobacterium carotovorum* isolados CO (A) e RP (B). Eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, amplificação de DNA por PCR através de primers específicos para *Pectobacterium carotovorum* (PC). Uso de primers indicados pelas letras EX – primers para detecção de *Pectobacterium carotovorum*., D – primers para identificação de *Dickeya sp.*, Y – primers para detecção geral de bactérias. Marcador de massa molecular (1 kb DNA plus Ladder, Termo Fisher) indicado pela letra M.

O resultado obtido pelo teste de PCR, concorda com os protocolos de detecção de *Dickeya* e *Pectobacterium* em tubérculos de batata, caules e água de irrigação, de 2017, utilizados pelo Serviço de Inspeção de Saúde de Animais e Plantas (APHIS), do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. No procedimento, há informações para a diferenciação de *Pectobacterium carotovorum* e *Dickeya sp.*, por meio dos primers utilizados. Consta que a detecção de *Pectobacterium* origina um amplicon de 550 pares de base para os primers Y45 e Y46 e para a detecção de *Dickeya*, origina um amplicon de 130 pares de base para os primers Df e Dr.

6.5. Teste de resistência em bulbos de *Zantedeschias*, Tulipas e Lírios

Para determinar a resistência foram utilizadas diversas cultivares de *Zantedeschia*, *Tulipa* e *Lilium* presentes no L.O.D.F.. Os bulbos foram inoculados e incubados por 48 horas em frascos de cultura, juntamente com algodão embebido em água destilada estéril, para obtenção de câmara úmida. Após os dois dias, os bulbos com as amostras dos isolados RP e CO obtiveram resultados similares aos encontrados nas iscas biológicas após a inoculação e incubação. Alguns bulbos utilizados apresentaram características semelhantes às encontradas na batata anteriormente testada com a bactéria em questão, podendo ser dito que a testagem biológica para a bactéria pectinolítica foi positiva.

Sendo assim, para ambos isolados, algumas cultivares dos propágulos testados, obtiveram resultados positivos, como evidenciado na Tabela 4, as cultivares de *Zantedeschia* foram: ‘Royal Princess’, ‘Captain Odeon’ e ‘Zazu’, para o isolado RP. Já para o isolado CO, foram: ‘Odessa’, ‘Captain Odeon’ e ‘Royal Vale’. A cultivar de Tulipa que obteve resultado positivo foi ‘Ile de France’ (Figura 13), para o isolado RP e nenhum para o isolado CO. Já os Lírios, ‘Vetto’, ‘Sisto’, ‘Roselily Monica’ e ‘Roselily Angela’ para o isolado RP e ‘Sisto, Bacardi’ e ‘Maldano’ para o isolado CO.



Figura 12. Bulbo de *Tulipa* cv. Ile de France, após teste de resistência.

De acordo com Ni *et al.* (2010), a temperatura é um fator crucial que influencia na patogênese de diversas culturas, ou seja, para cada cultura, a temperatura ideal pode variar, dentro do espectro mínimo e máximo. Eles citam que, para plantas de *Zantedeschia* spp., a temperatura ideal de crescimento bacteriano de *Pectobacterium carotovorum* é de 28°C. Sendo assim, pode-se dizer que, as plantas de *Zantedeschia* inoculadas com o isolado RP possuíam maiores chances de desenvolvimento bacteriano, pois eram incubadas a 28°C.

Ainda de acordo com Ni *et al.* (2010), para os bulbos inoculados com o isolado CO, alguns mostraram crescimento quando submetidos a temperaturas mais elevadas, como o caso das cultivares Sisto e Captain Odeon, que desenvolveram bem a temperaturas próximas a 28°C. Sendo assim, pode-se mostrar uma maior suscetibilidade a bactéria em questão.

Com relação ao controle positivo, foram utilizados tubérculos de *Solanum tuberosum* e todos foram favoráveis a bactéria. Porém, como para cada cultura há uma temperatura ideal para o desenvolvimento bacteriano, Pérombelon & Salmond (1995) afirmam que para a batata basta 25°C para o desenvolvimento de sintomas característicos de Podridão Mole. Então, acredita-se que se a temperatura de 28°C fosse aplicada também no isolado CO, poderia ser obtido maiores resultados positivos.

Porém, de acordo com Mello *et al.* (2017), a bactéria em questão possui grande agressividade em vegetais suscetíveis. Devido a isso, é de extrema importância evitar ou minimizar os efeitos da podridão mole. A temperatura mais baixa que 25°C no cultivo e umidade do ar abaixo de 55% pode favorecer as plantas ornamentais de resistirem as doenças causadas pela *Pectobacterium*.

Vale ressaltar que, a maior parte dos bulbos testados que tiveram resultados positivos a doença, são de finalidade para corte, como mostra a Tabela 4. De todos os positivados, apenas uma cultivar, 'Zazu', é usada para comercialização em vaso. Isso mostra que, essas plantas em campo de cultivo se tornam ainda mais suscetíveis as bactérias, devido as mesmas poderem estar de forma latente nas lenticelas dos caules e bulbos como afirmam Czajkowsk (2011) e Silva (2012). Com isso, com a ocorrência de tratos culturais e colheita, pode ocorrer a disseminação do patógeno até mesmo pelo material de trabalho (SILVA, 2012).

Tabela 3: Resultado do teste de resistência em bulbos de plantas ornamentais, inoculadas com suspensão bacteriana de *Pectobacterium*.

Bulbo	Cultivar	Isolado RP	UFC/mL	Temperatura (°C)	Isolado CO	UFC/mL	Temperatura (°C)	Uso
<i>Lilium pumilum</i>	Albufeira	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Breakout	-	3,1 x 10 ⁸	28,3	-	5,1 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Brindisi	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Corleone	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	1,2 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Dalian	-	3,1 x 10 ⁸	28,3	-	5,1 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Dynamix	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	El Divo	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Honesty	-	1,0 x 10 ⁸	27,6	-	1,0 x 10 ⁸	27,6	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Litouwen	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	McCarran	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte

<i>Lilium pumilum</i>	Menton	-	3,1 x 10 ⁸	28,3	-	5,1 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Merlet	-	3,1 x 10 ⁸	28,3	-	5,1 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Metropolitan	-	3,1 x 10 ⁸	28,3	-	5,1 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Nashville	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Nenzi	-	3,1 x 10 ⁸	28,3	-	5,1 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Pavia	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Pokerface	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Rodengo	-	1,0 x 10 ⁸	27,6	-	1,0 x 10 ⁸	27,6	Corte
<i>Lilium pumilum</i>	Tiny Bee	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Vaso
<i>Lilium pumilum</i>	Tiny Invader	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Vaso
<i>Lilium pumilum</i>	Tiny Pearl	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Vaso
<i>Lilium pumilum</i>	Yerseke	-	8,8 x 10 ⁸	28,0	-	8,4 x 10 ⁸	26,0	Corte

<i>Lilium speciosum</i>	Asterian	-	$8,1 \times 10^7$	28,1	-	$7,1 \times 10^7$	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Bacardi	-	$2,7 \times 10^8$	28,8	+	$1,2 \times 10^8$	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Bellville	-	$2,7 \times 10^8$	28,8	-	$1,2 \times 10^8$	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Castelani	-	$3,1 \times 10^8$	28,3	-	$5,1 \times 10^8$	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	El Doret	-	$4,3 \times 10^8$	29	-	$4,0 \times 10^8$	25	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Firebolt	-	$3,2 \times 10^7$	28,5	-	$4,8 \times 10^7$	26,7	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Joop	-	$4,3 \times 10^8$	29	-	$4,0 \times 10^8$	25	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	La Mancha	-	$2,7 \times 10^8$	28,8	-	$1,2 \times 10^8$	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Maldano	-	$2,7 \times 10^8$	28,8	+	$1,2 \times 10^8$	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Monteneu	-	$3,2 \times 10^7$	28,5	-	$4,8 \times 10^7$	26,7	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Nova Zembla	-	$3,1 \times 10^8$	28,3	-	$5,1 \times 10^8$	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Paradero	-	$4,3 \times 10^8$	29	-	$4,0 \times 10^8$	25	Corte

<i>Lilium speciosum</i>	Redford	-	1,0 x 10 ⁸	27,6	-	1,0 x 10 ⁸	27,6	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Roselily Angela	+	3,2 x 10 ⁷	28,5	-	4,8 x 10 ⁷	26,7	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Roselily Ciara	-	3,2 x 10 ⁷	28,5	-	4,8 x 10 ⁷	26,7	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Roselily Elena	-	2,7 x 10 ⁸	28,8	-	1,2 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Roselily Mônica	+	3,1 x 10 ⁸	28,3	-	5,1 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Santander	-	1,0 x 10 ⁸	27,6	-	1,0 x 10 ⁸	27,6	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Sibéria	-	3,1 x 10 ⁸	28,3	-	5,1 x 10 ⁸	25,5	Corte / Vaso
<i>Lilium speciosum</i>	Siponto	-	8,1 x 10 ⁷	28,1	-	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Sisto	+	1,0 x 10 ⁸	27,6	+	1,0 x 10 ⁸	27,6	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Sorbonne	-	3,2 x 10 ⁷	28,5	-	4,8 x 10 ⁷	26,7	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Starlight Express	-	4,5 x 10 ⁸	28,0	-	2,8 x 10 ⁸	26,0	Vaso
<i>Lilium speciosum</i>	Sunny Keys	-	2,7 x 10 ⁸	28,8	-	1,2 x 10 ⁸	25,5	Vaso

<i>Lilium speciosum</i>	Sunny Martinique	-	4,5 x 10 ⁸	28,0	-	2,8 x 10 ⁸	26,0	Vaso
<i>Lilium speciosum</i>	Sunny Robyn	-	3,1 x 10 ⁸	28,3	-	5,1 x 10 ⁸	25,5	Vaso
<i>Lilium speciosum</i>	Tabledance	-	3,2 x 10 ⁷	28,5	-	4,8 x 10 ⁷	26,7	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Tarrango	-	4,3 x 10 ⁸	29	-	4,0 x 10 ⁸	25	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Touchstone	-	3,2 x 10 ⁷	28,5	-	4,8 x 10 ⁷	26,7	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Vetto	+	1,0 x 10 ⁸	27,6	-	1,0 x 10 ⁸	27,6	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Yelloween	-	2,7 x 10 ⁸	28,8	-	1,2 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Zambesi	-	3,2 x 10 ⁷	28,5	-	4,8 x 10 ⁷	26,7	Corte
<i>Lilium speciosum</i>	Zelmira	-	3,2 x 10 ⁷	28,5	-	4,8 x 10 ⁷	26,7	Corte
<i>Tulipa gesneriana</i>	Barcelona	-	6,3 x 10 ⁷	27,8	-	2,7 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Tulipa gesneriana</i>	Ile de France	+	6,3 x 10 ⁷	27,8	-	2,7 x 10 ⁸	27,8	Corte
<i>Tulipa gesneriana</i>	Leen Van Der Mark	-	4,5 x 10 ⁸	27,8	-	2,8 x 10 ⁸	26,0	Corte

<i>Tulipa gesneriana</i>	Pallada	-	4,5 x 10 ⁸	27,8	-	2,8 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Tulipa gesneriana</i>	Royal Virgin	-	8,8 x 10 ⁸	27,8	-	2,7 x 10 ⁸	27,8	Corte
<i>Tulipa gesneriana</i>	Snowboard	-	4,5 x 10 ⁸	27,8	-	2,8 x 10 ⁸	26,0	Corte
<i>Tulipa gesneriana</i>	Strong Gold	-	6,3 x 10 ⁷	27,8	-	2,7 x 10 ⁸	27,8	Corte
<i>Tulipa gesneriana</i>	White Prince	-	3,6 x 10 ⁸	28,0	-	4,8 x 10 ⁸	28,0	Corte
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Allure	-	6,3 x 10 ⁷	27,8	-	2,7 x 10 ⁸	27,8	Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Captain Morelli	-	8,1 x 10 ⁷	28,1	-	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Captain Odeon	+	5,8 x 10 ⁸	25,5	+	5,0 x 10 ⁸	27,8	Corte
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Captain Promise	-	8,1 x 10 ⁷	28,1	-	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Captain Romance	-	8,1 x 10 ⁷	28,1	-	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Captain Trinity	+	8,1 x 10 ⁷	28,1	-	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Captain Ventura	+	8,1 x 10 ⁷	28,1	+	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte / Vaso

<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Golden Medal	-	8,1 x 10 ⁷	28,1	-	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte / Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Le Reve	-	8,1 x 10 ⁷	28,1	+	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte / Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Odessa	-	5,8 x 10 ⁸	25,5	+	5,0 x 10 ⁸	25,5	Corte / Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Orania	-	3,6 x 10 ⁸	28,0	-	4,8 x 10 ⁸	28,0	Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Outback	-	5,8 x 10 ⁸	25,5	-	5,0 x 10 ⁸	25,5	Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Paco	-	8,1 x 10 ⁷	28,1	-	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Passoa	-	8,1 x 10 ⁷	28,1	-	7,1 x 10 ⁷	25,5	Corte / Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Royal Princess	+	5,8 x 10 ⁸	25,5	-	5,0 x 10 ⁸	25,5	Corte
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Royal Valentine	-	5,8 x 10 ⁸	25,5	+	5,0 x 10 ⁸	25,5	Corte / Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Summer Sun	-	5,8 x 10 ⁸	25,5	-	5,0 x 10 ⁸	25,5	Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Sun Club	-	5,8 x 10 ⁸	25,5	-	5,0 x 10 ⁸	25,5	Vaso
<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Zazu	+	6,3 x 10 ⁷	27,8	-	2,7 x 10 ⁸	27,8	Vaso

6.6. Isolamento bacteriano através de Plantas de *Zantedeschia* naturalmente infectadas e de plantas parasitas e invasoras associadas

Os bulbos de plantas ornamentais foram plantados em vasos com turfa, na estufa do Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, na UFRRJ (Figura 5). Ao todo, foram feitos o plantio de cinco cultivares de *Zantedeschia* sp. ('Captain Odeon', 'Royal Princess', 'Sun Club', 'Royal Vale', 'Odessa'), além de mais seis de *Lilium* sp. ('Honesty', 'Dynamix', 'After Eight', 'Vetto', 'Brindisi', 'Nova Zelândia'). Durante o tempo de formação de brotação e emissão das folhas, as plantas se desenvolveram normalmente. Ao observar algumas cultivares com formação de inflorescências, era notório o pouco desenvolvimento das cultivares Captain Odeon e Royal Princess, de *Zantedeschia* sp.. As folhas tinham características de podridão, com a decomposição já avançada. Algumas folhas que ainda estavam fixadas no substrato e no bulbo, eram facilmente destacadas, com a base das folhas amolecidas e odor característico de *Pectobacterium carotovorum* (Figura 11).



Figura 13. Plantas de *Zantedeschia* sp. com sintomas de podridão mole.

As plantas com sintomas de podridão mole foram levadas para o Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, onde as folhas ainda fixadas no bulbo foram destacadas facilmente, desinfestadas por imersão a 15 segundos em água destilada, 15 segundos em hipoclorito a 25% e 15 segundos em água destilada estéril, e após, foram colocadas em água destilada estéril para obtenção de uma suspensão bacteriana. Inicialmente a suspensão foi inoculada em uma batata, a fim de confirmar a ação pectinolítica da bactéria em questão. A batata foi mantida em câmara úmida na temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, a fim de criar o ambiente perfeito para o desenvolvimento do inóculo. Após 48 horas, as batatas mostravam características de putrefação, com aspecto de derretimento do conteúdo celular da batata. Novamente foi feita uma suspensão bacteriana e a bactéria foi isolada em meio 523 de Kado & Heskett (1970).

Esse método foi utilizado por Barroso *et al.* (2020), para o isolamento de *Pectobacterium* em plantas de alface e acelga, a fim de completarem o Postulado de Koch.

Em 48 horas as placas estavam com colônias com características morfológicas da bactéria em questão (Figura 11). A partir desse resultado, foi feito o teste de Coloração de Gram, a fim de descobrir se a bactéria manipulada seria Gram Positiva ou Gram Negativa. O teste mostrou células em grande quantidade, com formatos de bastonetes, possuindo coloração rosea, indicando o resultado do teste como Gram Negativa.

Todas as características morfológicas, como coloração, formato da colônia, comportamento na isca biológica, formato das células e desenvolvimento em temperatura de 25 a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e crescimento a 37°C indicam que a bactéria em questão é *Pectobacterium carotovorum*.



Figura 14. Colônias após repicagem, obtidas após isolamento em Meio 523 da bactéria *Pectobacterium carotovorum* em folhas de *Zantedeschia* sp.

6.7. Teste de recuperação da bactéria por meio de suspensão rizosférica.

No teste de recuperação da bactéria por meio de suspensão rizosférica, após 24 horas da inoculação, observou-se a presença de colônias de bactérias, algumas com características semelhantes de *Pectobacterium*. Essas colônias foram repicadas em meio 523 de Kado & Heskett (1970) e incubadas a temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ em estufa bacteriológica por 24 horas. Ao mesmo tempo, o método de isca biológica também foi utilizado, para confirmar a presença de bactérias pectinolíticas, obtendo resultado positivo ao final do ensaio.

Perombelon & Kelman (1980), afirmam que as *Pectobactérias* têm como forma de sobrevivência a colonização da rizosfera de plantas daninhas, podendo sobreviver no ambiente até a disponibilidade de novos hospedeiros suscetíveis.

No processo de colonização bacteriana, a bactéria, por meio de suas atividades flagelares, ou de modo passivo pelo fluxo de água do solo, move-se em direção às raízes das plantas infestantes no ambiente onde o microrganismo se encontra. Ao se ligar a rizosfera, a bactéria sofre algumas divisões celulares, se estabelecendo no local por meio de micro colônias (SPRENT & DEFARIA, 1988; FURDOUS *et al.*, 2019; MIGUEL *et al.*, 2020).

Na ocorrência de hospedeiros suscetíveis, as bactérias que sobreviveram na rizosfera das plantas daninhas movem-se quando irrigados por meio de seus flagelos, chegando ao caule da planta, em seguida para as folhas inferiores, iniciando o processo de infecção (PEROMBELON & KELMAN, 1980).

O controle de *Pectobacterium carotovorum*, é considerado difícil por alguns autores, como Popovic *et al.* (2019), que chegaram a considerar que não há tratamento efetivo para bactérias de podridão mole, sendo a prevenção a única forma de controle. Além disso, afirmam que a identificação precoce do patógeno pode desempenhar um papel fundamental na supressão da propagação da bactéria, sendo uma forma de medida mitigatória no controle da *Pectobacterium*.

De acordo com Alvarado *et al.* (2007), solos com características supressivas são uma alternativa viável, pois por meio dele se tem a possibilidade do controle de doenças com grande eficiência com menores danos ambientais. Eles inibem naturalmente o desenvolvimento e

estabelecimento de patógenos, ou inibem as atividades patogênicas por meio da ação de microrganismos presentes, alterando também a estrutura do solo. Além da inibição natural, pode ser empregada uma técnica para transformação de solos condutivos em supressivos artificialmente, por meio de tratamento térmico (BETTIOL & GHINI, 2005).

Ao longo do tempo, as empresas de insumos agrícolas vêm desenvolvendo produtos químicos para controle de pragas e fitopatógenos em culturas cultivadas. Eles também são utilizados como indutores, para induzir resistência nas plantas contra hospedeiros suscetíveis. Muitos compostos desenvolvidos foram utilizados com sucesso em campo e em condições laboratoriais. Não são tóxicos para animais, plantas e humanos e não influencia no crescimento fisiológico. Um desses indutores é o ácido salicílico, onde apresenta baixo custo, confere longa proteção a planta e gera lucro ao produtor (PRASANNATH, 2017; KUC, 2001; MIURA & TADA, 2014).

Wu *et al.* (2017), utilizaram o ácido salicílico como fonte de resistência contra a *Pectobacterium carotovorum* em plantas de *Zantedeschia*. Os resultados deles sugeriram que as plantas do gênero dependem do mecanismo de defesa da resistência adquirida sistemicamente para limitar o patógeno, matando-o ou inibindo-o. O ácido salicílico funciona como um indutor de resistência sistêmica, podendo ser usado no tratamento de tubérculos, antes do plantio, ou nas plantas no campo. Merzah & Kadhim (2020), testaram o método em plantas de batata, com diversas concentrações, onde as de 0,05% e 0,1% foram capazes de induzir resistência às plantas, aumentando a taxa de acúmulo de fenol e atividade da peroxidase, indicadores de resistência sistêmica.

De acordo com Lopes e Reis (2016), o controle de *Pectobacterium* deve ser feito por meio de medidas culturais e preventivamente. Plantar em solo onde anteriormente não se cultivou plantas hospedeiras da bactéria ou que não estejam infestados com a doença e preparar o solo de forma que não ocorra compactação do solo; no verão, deve-se fazer canteiros mais altos a fim de não ocorrer acúmulo de água próximo ao local de desenvolvimento de raízes; fazer o controle de nematoides e insetos, evitando o ferimento na região radicular e se possível, fazer rotação de culturas. Após o aparecimento da doença, não há controle químico eficaz para eliminar a doença.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após testes biológicos e moleculares, foi possível detectar a bactéria *Pectobacterium carotovorum*, causadora de Podridão Mole em bulbos de Plantas Ornamentais destinadas ao Agronegócio.

Temperaturas abaixo de 28°C podem ser insuficientes para o desenvolvimento do patógeno em bulbos de plantas ornamentais, já confirmados em *Zantedeschia* sendo também possível para Lírios e Tulipas.

No teste de resistência, as cultivares Captain Odeon e Captain Ventura, de *Zantedeschia* sp. foram as mais afetadas, assim como o Lírio Sisto e a Tulipa Ile de France. Ambas podem ser utilizadas como controle positivo para a bactéria.

A severidade da doença é grande, causa expressivos prejuízos e possui um amplo espectro de hospedeiros, podendo infectar grande quantidade de culturas com alto valor comercial, estando vulneráveis ao agente da doença, causando grandes perdas econômicas.

Medidas de controle devem ser adotadas por meio de medidas culturais visto que, até o momento, não há controle químico eficaz do agente da doença, após o seu aparecimento.

Após os resultados obtidos, foi possível a elaboração de um protótipo de kit de diagnóstico biológico e molecular para detecção de *Pectobacterium carotovorum*, causadora da Podridão Mole em Plantas Ornamentais, assim como em seu material propagativo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NAUSHAD, S.; GUPTA, R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575-5599, 2016.

ALMEIDA, I. M. G. Importância de bactérias fitopatogênicas em plantas ornamentais e seu controle. In: Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico, XIV, 2006. **Anais da XIV Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**. Pariquera-Açu – SP. 2006. P. 7-12.

ALVARADO, I. C. M. **Variabilidade e ecologia de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, agente da podridão-mole em couve chinesa**. Dissertação (Mestrado em Agronomia Área Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 102p. 2006.

ANGUIANO CABELLO, J.; ARREDONDO VALDÉS, R.; CERNA CHÁVEZ, E., BELTRAN BEACHE, M.; DELGADO ORTIZ, J. C.; & OCHOA FUENTES, Y. M. Revisión de técnicas de diagnóstico de *Brenneria* spp en nogal (*Juglans regia*). **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 34, n. 2, p. 158-172, 2016.

BARROSO, K. A., NETO, T. F. D. S. C., DE OLIVEIRA, X. B., NÓBREGA, T. F., CABRAL, L. F., DA PAZ, C. D., & PEIXOTO, A. R.. Resistência de variedades de alface à podridão mole causada por *Pectobacterium aroidearum*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 101914-101925, 2020.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, 3. Ed. São Paulo, SP: Ceres, 1995, v. 1. 919p.

BERIAN, L. O. S.; OCCHIENA, E. M. **Doenças bacterianas**. In: BRANDÃO FILHO, J. U. T.; FREITAS, P. S. L.; BERIAN, L. O. S.; GOTO, R.. comps. **Hortaliças-fruto** [online]. Maringá: EDUEM, 2018, pp. 209-240. ISBN: 978-65-86383-01-0. <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0008>.

BETTIOL, W. & GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, F., ANDRADE, D. E. G. T. & Menezes, M. (Eds.) **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife PE. Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2005. pp. 125-152. ISBN 85-87459-09-0

BOTELHO, F. B. S.; RODRIGUES, C. S.; BRUZI, A. T.. Ornamental plant breeding. **Ornamental Horticulture**, v. 21, n. 1, p. 9-16, 2015.

BRADY, C. L.; COUTINHO, T. A. *Lonsdalea*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-9, 2015.

BUSSI, C. M. C. Uma revisão sobre os efeitos benéficos de fitoquímicos presentes em flores comestíveis. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, n 74, Brasil, 2018.

CARDOZA, Y. F.. **Espécies de Dickeya associadas à batata-consumo e semente**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. 99f. Porto Alegre, RS, 2015.

CARMO, G. J. S. Detecção de podridão mole em alface por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* por algoritmos de aprendizado de máquina a partir de imagens multiespectrais. **Dissertação – Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais**. Universidade Federal de Uberlândia – MG, 2021.

CHARKOWSKI, A. O. Biology and control of *Pectobacterium* in potato. **American Journal Potato Research**. 2015; 92: 223-229. doi: <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9447-7>

COLODEL, S. O. M. T.; DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. Vol. 29, n. 6 (nov./dez. 2004), p. 620-625, 2004.

COSTA, R. G. S.; COLESANTI, M. M. A contribuição da percepção ambiental nos estudos das áreas verdes. **RA' E GA - O Espaço Geográfico em Análise**, v. 22, n. 22, p. 238–251, 2011.

CZAJKOWSKI, R., PEROMBELON, M. C., VAN VEEN, J. A., & VAN DER WOLF, J. M. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, p. 999–1013, 2011.

DALE, C.; MAUDLIN, I. *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 267-275, 1999.

DE BOER, S. H.; KELMAN, A. *Erwinia* soft rot group. In SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**, St. Paul: APS Press, p. 56-72, 2001.

DE MAAYER, P.; CHAN, W. Y.; BLOM, J.; VENTER, S. N.; DUFFY, B.; SMITS, T. H. M.; COUTINHO, T. A. The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. **BMC Genomics**, 13, 625, 1471-2164. 2012.

DOS SANTOS, A. A., DE SOUZA, J. L. M., JARECK, T. M., & BARROCA, M. V. Isolamento e quantificação de *Pectobacterium* spp. em água de irrigação utilizando meio cristal violeta pectato. **Acta Biológica Catarinense**, v. 7, n. 3, p. 65-73, 2020.

FIRDOUS, J.; LATHIF, N. A.; MONA, R.; MUHAMAD, N. Endophytic bacteria and their potential application in agriculture: A review. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 53, n. 1, p. 1-7, 2019.

FONTES, R. V.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Ed.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Centro-Oeste. Brasília, DF: MMA. **Série Biodiversidade** v.44., 2018.

FRAGUAS, C. B.; CHAGAS, E. A.; SILVA, E. F.; PASQUAL, M.; OLIVEIRA, P. D. Cultura do Lírio. **Boletim de Extensão**. Lavras: UFLA, 2002.

GUTTMAN, Y., JOSHI, J. R., CHRIKER, N., KHADKA, N., KLEIMAN, M., REZNIK, N., WEI, Z., KEREM, Z. & YEDIDIA. Ecological adaptations influence the susceptibility of plants in the genus *Zantedeschia* to soft rot *Pectobacterium* spp. **Horticulture Research**, v. 8, 2021.

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

HAYWARD, L. E. R. B.; MARIANO, R. L. R. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procariotos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p. 199-234, 1997.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R.; STUMPF, E. R. T. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v.12, n.1, p. 2-7, 2006.

HENZ, G. P. Doenças da mandioquinha-salsa e sua situação atual no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 135-144, 2002.

HÉLIAS, V., HAMON, P., HUCHET, E., WOLF, J. V. D.; ANDRIVON, D. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. **Plant Pathology**. 2012; 61: 339-345. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02508.x>

HOLT, J. G., BERGEY, D. H.. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; JACOT-DES-COMBES, C; BRIOLAY, J.; PRITCHARD, L. Proposal for the creation of a new genus *Musicola* gen. nov., reclassification of *Dickeya paradisiaca* (Samson *et al.* 2005) as *Musicola paradisiaca* comb. nov. and description of a new species *Musicola keenii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2021 ; Vol. 71, No. 10.

IBRAFLOR, Release Imprensa – **O Mercado de Flores no Brasil**. 2019. Disponível em: https://docs.wixstatic.com/ugd/875639_f02d8909d93a4f249b8465f7fc0929b4.pdf Acesso em : 04 jun. 2020.

IBRAFLOR - **Situação atual do mercado de flores e plantas ornamentais**. 2021. Disponível em: <https://www.ibraflor.com.br/post/situa%C3%A7%C3%A3o-atual-do-mercado-de-flores-e-plantas-ornamentais>. Acesso em: 21 fev. 2022

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. 1970; 60: 969-979. doi: 10.1094/phyto-60-969

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

KAHVECI, A., ASICIOGLU, E., TIGEN, E., ARI, E., ARIKAN, H., ODABASI, Z., & OZENER, C. Unusual causes of peritonitis in a peritoneal dialysis patient: *Alcaligenes faecalis* and *Pantoea agglomerans*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 1, p. 1-3, 2011.

KIKUMOTO, T. Ecological aspects of soft rot bacteria. **Report of the Institute for Agricultural Research, Tohoku University**. v.31:19- 41. 1980.

KUC, J.. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **Eur. J. Plant Pathol.**, 107: 7-12. 2001

KUEHNY, J. S. Calla history and culture. **HortTechnology**, v. 10, n. 2, p. 267-274, 2000.

LEE, S. D., KIM, I. S., CHOE, H.; KIM, J. S.. *Acerihabitans arboris* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Pectobacteriaceae isolated from sap drawn from *Acer pictum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 004674, 2021.

LETTY, C. The genus *Zantedeschia*. **Bothalia**, v. 11, n. 1/2, p. 5-26, 1973.

LIM, Ki-B.; VAN TUYL, J. M. Lily – *Lilium* hybrids. **Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century**. Capítulo 19, p.517-537, 2006

LOPES, C. A.; REIS, A. **Doenças da cenoura**. Embrapa Hortaliças, Brasília – DF. p.33, 2016.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil - arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3 ed. Nova Odessa: Plantarum, 1120p. 2001.

MANSFIELD, J., GENIN, S., MAGORI, S., CITOVSKY, V., SRIARIYANUM, M., RONALD, P., DOW, M., VERDIER, V., BEER, S. V., MACHADO, M. A., TOTH, I., SALMOND, G. & FOSTER, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. 2012; 13: 614-629. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>

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

MARQUES, R. W. C.; CAIXETA FILHO, J. V. Avaliação da sazonalidade do mercado de flores e plantas ornamentais no Estado de São Paulo. **Ornamental Horticulture**, v. 9, n. 2, 2003.

MELLO, S. C. M. ***Pectobacterium carotovorum*: taxonomia, identificação, sintomatologia, epidemiologia e controle**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, v.1 17p. 2008.

MELLO, M. R. F.; SOUZA, E. B.; PINTO, K. M. S.; GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R. Redução da podridão mole em couve-chinesa mediada por indutores de resistência. **Revista CIENTEC**, v.9, n.2, p. 15-24, 2017.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. v.3, 308 p.

MERZAH, N. R.; KADHIM, J. H. Efficiency of salicylic acid in induce systemic resistance in potato plants against *Pectobacterium carotovorum*. **Plant Archives**, v. 20, n. 1, p. 244-248, 2020.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 2001. 172 p.

MICHEREFF, S. J. Bactérias como agentes de doenças de plantas. **Recife-PE: UFRPE**, 2016.

MIGUEL, P. S. B.; DELVAUX, J. C.; OLIVEIRA, M. N. V.; CAMARGO, R.; FRANCO, M. H. R.; SOBREIRA, H. A.; JARDIM, V. H. P. Bactérias endofíticas: Colonização, benefícios e identificação. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 8777-8791, 2021.

MIURA, K.; Y. TADA (2014). Regulation of water, salinity and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers in Plant Science**, 5(4): 1-12.

MUÇOUÇAH, F.J. **Indução floral do copo de leite colorido (*Zantedeschia sp*) com ácido giberélico (GA3) aplicado vias irrigação, foliar e imersão, nas condições de Botucatu, SP. 2002.** viii, 68 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2002.

MÜNCH, R.. Robert Koch. **Microbes and infection**, v. 5, n. 1, p. 69-74, 2003.

NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A. **Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil**. São Paulo: OCESP, 2015.

NI, L.; GUO, L.; CUSTERS, J. B. M.; ZHANG, L. Characterization of calla lily soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* zt0505: Bacterial growth and pectate lyase activity under different conditions. **Journal of Plant Pathology**, p. 421-428, 2010.

NPC. 2017. **Protocol for detection of *Dickeya* and *Pectobacterium* in potato tubers, stems, or irrigation water**. NPC Seed Certification Sub-Committee.National Potato Council. https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/potato/downloads/dickeya/npc-dickeya-protocol.pdf Acesso em: maio de 2022

PÉROMBELON, M. C. M.; SALMOND, G. P. C. 1995. Bacterial Soft Rots. In: SINGH, U.S., SINGH, R.P.; KOHMOTO, K., Eds., **Pathogenesis and Host specificity in Plant Diseases**, Vol. 1: Prokaryotes, Pergamon, Oxford, 1-20. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-042510-8.50008-x>

PÉROMBELON, M. C. M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot Erwinias. **Annual Review of Phytopathology** 18:361-387. 1980.

PERTWEE, J. **International Cut Flower Manual**. UK, Ed Pathfast Publishing, pg 102- 105, 1999.

PIRES, J. C. V.. **Robert Koch (1843-1910): percursos científicos de um bacteriologista**. Monografia (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, PT. 60p. 2017.

POPOVIĆ, T.; JELUŠIĆ, A.; MARKOVIĆ, S.; ILIČIĆ, R. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolates from a recent outbreak on cabbage in Bosnia and Herzegovina. **Pesticidi i fitomedicina**, v. 34, n. 3-4, p. 211-222, 2019.

PRASANNATH, K.. Plant defense-related enzymes against pathogens: a review. **AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences**, 11(1): 38-48. 2017.

QUEIROZ, M. F.; ALBUQUERQUE, G. M.; GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R. ; MORAES, A. J. ; SOUZA, E. B.; SOUZA, J. B.; PAZ, C. D.; NÓBREGA, T. F. ; PEIXOTO, A. R.. Ocorrência de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* em couve no Brasil. **Anais do 50º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Uberlândia, Minas Gerais, 2017.

REIS, J. L. C. S.; MARAFON, G. J. A dimensão espacial da rede de flores e plantas ornamentais do Estado do Rio de Janeiro: Uma Análise a partir do município de Nova Friburgo, entre os anos de 2002 e 2018. **Geo UERJ**, n. 36, p. e47278, 2020.

ROMEIRO, R. S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV; 2001. 279 p.

SAGDIC, O.; EKICI, L.; OZTURK, I.; TEKINAY, T.; POLAT, B.; TASTEMUR, B.; BAYRAM, O.; SENTURK, B. Cytotoxic and bioactive properties of different color tulip flowers and degradation kinetic of tulip flower anthocyanins. **Food Chem Toxicology**; v.58: p.432-439, 2013.

SAMSON, R.; LEGENDRE, J. B.; CHRISTEN, R.; FISCHER-LE SAUX, M.; ACHOUAK, W.; GARDAN, L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.55, p.1415-1427, 2005

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Flores e plantas ornamentais do Brasil**. Brasília, DF, 2015. 42 p. (Série Estudos mercadológicos).

SHAO, Q.; HE, S. L.; WU, J. Z.; WU, H. Z.; LIU, X. J. Resistance response of *Zantedeschia aethiopica* and a colored *Zantedeschia* hybrid to a soft rot pathogen. In: **XII International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials 1171**. 2016. p. 323-330.

SILVA, A. S. **Percloroato de ferro como sinalizador de injúrias em tubérculos de batata e caracterização de isolados de *Pectobacterium* spp.** 2012. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 134p. 2012.

SMORIGO, J. N.I.; JANK, M. S.. Análise da eficiência dos sistemas de distribuição de flores e plantas ornamentais no Estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. v.39, n.1, p. 35-52, 2001.

SOARES, F. C.; MELLO, R. P.; PEITER, M. X.; BELLE, R. A.; ROBAINA, A. D.; VIVIAN, G. A.; PARIZI, A. R. C.. Consumo de água pela cultura do lírio, cultivado em substratos alternativos em condições de ambiente protegido. **Revista Ciência Rural, Santa Maria**. v.42, n.6, p.1001-1006, jun, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. J. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

SPRENT, J. I.; DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.

TAKATSU, A.; MELLO, S. C. M.; GARCIA, E. S. O. B. Fruto de pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 550-551, 1981.

TEBALDI, N. D.; MOTA, L. C. B. M. Ocorrência de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em pseudocaule da bananeira em Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 186-186, 2014.

TIMBOLATO, A. F. C.; UZZO, R. P.; JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S.; STANCARO, G. C.; ALEXANDRE, M. A. V. Bulbosas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v.16, n.2, p. 127-138, 2010.

VAN TUYL, J. M.; VAN CREIJ, M. G. M. *Tulipa gesneriana* and T. hybrids. **Flower breeding and genetics: issues, challenges and opportunities for the 21st century**, v. 623, p. 641, 2006.

VERBARG, S.; FRÜHLING, A.; COUSIN, S.; BRAMBILLA, E.; GRONOW, S.; LÜNSDORF, H.; STACKEBRANDT, E. *Biostraticola tofi* gen. nov., spec. nov., a novel member of the family Enterobacteriaceae. **Current Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 603-608, 2008.

WU, H. Z., LIU, X. J., SHAO, Q., HE, S. L., & WU, J. Z.. Resistance response of *Zantedeschia aethiopica* and a colored *Zantedeschia* hybrid to a soft rot pathogen. **Acta Horticulturae**, n. 1171, p. 323- 329, 2017.

WINSLOW, C. E .A.; BROADHURST, J.; BUCHANAN, R. E.; KRUMWIEDE JUNIOR, C.; ROGERS, L. A.; SMITH, G. H. The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.2, p.505-566, 1917.

9. ANEXO

9.1. BIOMPC - Protótipo de *Kit* diagnóstico biológico e molecular de *Pectobacterium carotovorum*

KIT BIOPCC

Uso Pretendido

O *Kit BIOMPC* foi produzido para diagnosticar biologicamente e molecularmente *Pectobacterium carotovorum* (PC) facilitando o diagnóstico da presença de *Pectobacterium carotovorum* em espécies vegetais, visto que a doença possui desenvolvimento rápido, fácil disseminação e alta severidade.

A *Pectobacterium* ocorre em diversas espécies vegetais, sendo elas ornamentais e hortaliças.

O *Kit BIOMPC* funciona por meio de teste de patogenicidade, onde inocula-se uma suspensão bacteriana em bulbos de *Zantedeschia aethiopica* cv. Captain Odeon e *Lilium speciosum* cv. Sisto, assim como em tubérculos de *Solanum tuberosum*, sendo complementado com o Teste de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), formando um método de diagnóstico sensível para a detecção da bactéria. Os *primers* utilizados são baseados nas regiões do genoma da bactéria, podendo detectá-la em espécies vegetais.

Armazenamento

Parte do *kit*, como água destilada esterilizada, tubérculos de batata, bulbos de *Zantedeschia aethiopica* cv. Captain Odeon e *Lilium speciosum* cv. Sisto deverão ser armazenados de 4°C a 6°C por até 3 meses.

Os *primers*, ressuspensos em 200µL de água destilada, deionizada e autoclavada, são estáveis durante um ano, se armazenados a -10°C, não sendo documentado o efeito do congelamento e descongelamento.

Etapa de detecção biológica

Precauções

Antes de iniciar o ensaio, as bancadas devem ser higienizadas com Álcool Etilico a 70% antes do uso.

O uso de luvas de látex é indispensável.

O *Kit BIOMPC* foi otimizado com materiais, equipamentos e reagentes descritos abaixo, portanto, recomenda-se utilizar, principalmente, os mesmos itens para se obter êxito nos resultados.

Materiais e equipamentos

Água destilada e deionizada estéril

Alça de platina

Algodão

Autoclave

Caneta *Pilot*

Deionizador de água

Destilador de água

Faca

Fluxo Laminar

Hipoclorito de Sódio a 25%

Lamparina

Micropipeta (P1000)

Palitos de madeira autoclavados

Placas de Petri

Plástico de polistireno

Ponteiras para micropipeta (P1000)

Recipiente de Vidro de 225 ml com Rosca

Procedimento:

- 1 - Para iniciar o processo, é necessário o uso de luvas e jaleco pelo analista.
- 2 – Fazer assepsia das luvas e do fluxo laminar que será utilizado no procedimento, com álcool a 70%.
- 3 – No Fluxo, as amostras que serão analisadas são desinfestadas da seguinte maneira: 15 segundos em água destilada e deionizada estéril, 15 segundos em hipoclorito a 25% e por fim, mais 15 segundos em água destilada e deionizada estéril.
- 4 – Ainda no fluxo, com a lamparina acesa, com o auxílio da alça de platina, retira-se uma pequena amostra do material com sintomas de podridão mole e deposita-se em uma placa de Petri esterilizada. Após, coloca-se aproximadamente 10mL de água destilada e deionizada estéril, incubando em temperatura ambiente por aproximadamente cinco minutos.
- 5 – Com o uso de uma micropipeta P1000, coleta-se 500µL da suspensão bacteriana obtida e deposita-se em um bulbo de *Zantedeschia aethiopica* cv. Captain Odeon. Repita o procedimento para o bulbo de *Zantedeschia aethiopica* cv. Sisto. Após a deposição da suspensão bacteriana, com o auxílio de um palito de madeira autoclavado, deve-se fazer um ferimento onde houve a deposição da suspensão bacteriana, para facilitar a entrada do patógeno nos bulbos suscetíveis. Os bulbos deverão ser colocados em recipiente de vidro de 225 ml com rosca juntamente com um chumaço de algodão embebido em água destilada e deionizada estéril.
- 6 – Com o uso de uma faca, corta-se o tubérculo de batata, e com a micropipeta P1000, deposita-se no corte 500µL da suspensão bacteriana. O tubérculo de batata deve ser envolvido com plástico de polistireno e colocado em recipiente de vidro de 225 ml com rosca juntamente com um chumaço de algodão embebido em água destilada e deionizada estéril.
- 7 – Ambos devem ser colocados em estufa B.O.D. por 48 horas a 28°C

Resultado

Após as 48 horas, ambos os bulbos e o tubérculo de batata deverão apresentar sintomas de podridão mole. O tubérculo de batata deverá apresentar sintomas obrigatoriamente, para

comprovar que a bactéria é pectinolítica. Como o tubérculo de batata desenvolve os sintomas com a temperatura mais baixa (25°C), o tubérculo de batata estará com uma severidade maior que os bulbos. Se ambos apresentarem características da doença, há confirmação da presença de bactéria pectinolítica.

Etapa de detecção molecular

Materiais e Equipamentos

Agarose para Biologia Molecular

Agitador Magnético (Vortex)

Água destilada, deionizada, tratada com DEPC e esterilizada

Autoclave

Balança Analítica

Bloco Térmico

Brometo de Etídio

Caneta Pilot

Cuba de Eletroforese e Acessórios

Deionizador de Água

Destilador de Água

Dietil Pirocarbonato de Sódio (DEPC)

Etanol 70%

Etanol 96%

Fonte de Eletroforese

Freezer

Geladeira

Jaleco

Kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN Brasil)

Luvas de Látex

Microcentrífuga

Microondas

Micropipeta (P20, P200, P1000)

Papel Toalha

Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Thermo Fisher)

Ponteiras para micropipeta (P20, P200, P1000)

Proteinase K

Relógio Digital

Tampão TAE

Termociclador

Termometro digital

Transluminador de Luz Ultravioleta

Tubos de polipropileno (0,5mL, 1,5mL, 2mL)

Extração de DNA e Teste de PCR

1 - Assinalar, pelo Analista, no formulário específico que acompanha a amostra (por exemplo, REG-72.PCR) o número da amostra protocolado

2 - Colocar luvas descartáveis, fazer assepsia da mesma e da bancada de trabalho com etanol 70%

3 - Depositar, com o auxílio da micropipeta P1000, um ml da suspensão bacteriana em tubo de polipropileno de 1,5 ml. Fechar o tubo de polipropileno de 1,5 ml, depositar na microcentrifuga e, centrifugar a 5000 x g (7500 rpm) por dez minutos. Descartar o sobrenadante, abrir o tubo de polipropileno e ressuspender o pellet pela adição, com o auxílio de micropipeta P200, de 180 µl de tampão ATL (componente do DNeasy® Blood & Tissue Kit). Adicionar, com o auxílio

de Micropipeta P200, 20µl de Proteinase K ao tubo de polipropileno de 1,5 ml contendo 180 µl de tampão ATL. Fechar o tubo de polipropileno e misturar pelo Vortex por um minuto. Seguir para o item 4

4 - Depositar o tubo de polipropileno no Bloco Térmico e incubar a 56°C por oito a 12 horas

5 - Retirar o tubo de polipropileno do Bloco Térmico e misturar no Vortex por 15 segundos. Abrir o tubo de polipropileno e adicionar, com o auxílio da micropipeta P1000, 200 µl do tampão AL (componente do *Kit DNeasy® Blood & Tissue*)

6 - Fechar o tubo de polipropileno e misturar no Vortex por 15 segundos

7 - Abrir o tubo de polipropileno e adicionar, com o auxílio da micropipeta P1000, 200 µl de etanol (96%) gelado (mantido no Freezer na faixa de temperatura de -35°C a 0°C), com o auxílio da micropipeta P1000.

8 - Fechar o tubo de polipropileno e misturar no Vortex por 15 segundos

9 - Abrir o tubo de polipropileno e pipetar, com o auxílio da micropipeta P1000, a mistura na coluna *DNeasy Mini spin column* inserida no *Collection Tube* de 2 ml. Depositar, na microcentrifuga, a mini-coluna branca inserida no tubo de dois ml (*Collection Tube*) e, centrifugar a 6000 x g por um minuto. Descartar o eluído e o *Collection Tube*

10 - Transferir a *DNeasy Mini spin column* para outro *Collection Tube* e adicionar, com o auxílio da micropipeta P1000, 500 µl de tampão AW1 na coluna *DNeasy Mini spin column* inserida no *Collection Tube* de 2 ml. Depositar, na microcentrifuga e, centrifugar a 6000 x g por um minuto. Descartar o eluído e o *Collection Tube*

11 - Transferir a coluna *DNeasy Mini spin column* para outro *Collection Tube* e adicionar, com o auxílio da micropipeta P1000, 500 µl de tampão AW2 na coluna *DNeasy Mini spin column* inserida no *Collection Tube* de 2 ml. Depositar, na microcentrifuga e, centrifugar a 16100 x g por cinco minutos. Descartar o eluído e o *Collection Tube*

12 - Transferir a coluna *DNeasy Mini spin column* para um tubo de polipropileno de 1,5 ml

13 - Adicionar, com o auxílio da micropipeta P1000, 200 µl de tampão AE na coluna *DNeasy Mini spin column* inserida em tubo de polipropileno de 1,5 ml. Incubar por um minuto a temperatura ambiente (15°C a 25°C), seguida de deposição na microcentrifuga

14 - Centrifugar a 6000 x g por um minuto

15 - Retirar o tubo de polipropileno de 1,5 ml contendo a coluna *DNeasy Mini spin column*, eliminar a coluna *DNeasy Mini spin column* sendo que o DNA extraído permanece no tubo de polipropileno de 1,5 ml

16 - Identificar o tubo de polipropileno com o número da Amostra e manter no Freezer (na faixa de temperatura de 0°C a -35°C) até posterior uso no teste de PCR

17 - Para o Teste de PCR retirar, com o auxílio de micropipeta P20, do tubo de polipropileno marcado com o número da amostra, 2 µl do DNA extraído e, proceder ao uso dos produtos constantes no *Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity (Thermo Fisher)* segundo instruções do fabricante, tendo os *primers* específicos ExpccF (5'-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3') e Expccr (5-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3') e condições de amplificação utilizados: pré-desnaturação a 95°C por quatro minutos; 30 ciclos seguidos de 94°C de desnaturação inicial por 45 segundos, anelamento a 62°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos; seguido de um ciclo final de extensão final de 72°C por cinco minutos, 4°C por cinco minutos no termociclador para a praga alvo conforme assinalado no formulário REG-72.PCR

18 - Após a amplificação, no termociclador, da amostra de DNA proceder a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X contendo brometo de etídio e, posterior visualização em transiluminador de luz ultravioleta

19 - Registrar o resultado no formulário REG-72.PCR

20 - Guardar todo o material utilizado, limpar o local de trabalho

Resultados

O teste acima pode detectar isolados de *Pectobacterium carotovorum* de forma rápida e eficaz, facilitando a identificação da bactéria em bulbos ou rizomas de plantas ornamentais e de outras espécies vegetais.

Controles Positivos devem ter massa molecular de seus respectivos *amplicons* (550 pb) indicada no formulário REG-72.PCR e facilmente detectável após a eletroforese.

REG-72.PCR

ENSAIO/ CÓDIGO DO PROCEDIMENTO

Título:

Ensaio n°:

Código do Procedimento:

AMOSTRA (MATRIZ)

Número da Amostra:

Sintoma (Especifique):

CICLO UTILIZADO NO TERMOCICLADOR

Data: / /

Responsável pela Extração de DNA:

Número de Repetição de Extração de DNA/ Amostra:

Código dos Equipamentos utilizados:

Reagentes e Soluções

ITEM	LOTE/ VALIDADE
<i>DNeasy Plant Mini Kit</i>	
• Tampão (especificar o tampão)	
• Proteinase K	
• Tampão (especificar o tampão)	
• Tampão AW1	
• Tampão AW2	
• Tampão AE	
Água (Destilada, deionizada, tratada com DEPC e autoclavada)	

Controle Branco de Extração (CBE) (Tubo com Água somente): Presente () Ausente ()

Controle Endógeno de Extração (CEE) (Controle Interno para a verificação da Extração de DNA):
Presente () Ausente ()

REAÇÃO DE PCR		
Data: / / Responsável pela Reação de PCR:		
Número de Repetição de Reação de PCR/ Amostra:		
Código dos Equipamentos utilizados:		
Reagentes e Soluções		
ITEM	LOTE/ VALIDADE	
Água (Destilada, deionizada, tratada com DEPC		
<i>Forward Primer</i> ExppcF		
<i>Reverse Primer</i> ExpccR		
<i>Kit</i> Platinum PCR SuperMix High Fidelity		
Componentes da Reação: 1. Água (Destilada, deionizada, tratada com DEPC e autoclavada) 2. <i>Forward Primer</i> ExpccF 3. <i>Reverse Primer</i> ExpccR 4. Kit Platinum PCR SuperMix High Fidelity 5. DNA extraído com <i>DNeasy Blood & Tissue</i> Volume Total Controle Branco de Extração (CBE) (Tubo com Água somente): Presente () Ausente () Controle Endógeno de Extração (CEE) (Controle Interno para a verificação da Extração de DNA): Presente () Ausente () Controle Branco de Reação (CBR) de PCR: Presente () Ausente () Controle Positivo (CP) (presença de DNA alvo) da Reação de PCR: Presente () Ausente () Controle Negativo (CN) (ausência de DNA alvo) da Reação de PCR: Presente () Ausente ()	Volume: µlµlµlµlµl µl	Quantidade de Amostra para o Gel: 18 µl/ poço Preparo do Ladder: 16 µl TAE 1X + 2µl de DNA <i>Ladder*</i> + 2µl tampão de Amostra <input type="checkbox"/> 1 kb <i>plus</i> DNA <i>Ladder</i> <input type="checkbox"/> 100 pb DNA <i>Ladder</i> <input type="checkbox"/> 50 pb DNA <i>Ladder</i> <input type="checkbox"/> <i>Ultra Low Range</i> DNA <i>Ladder</i> <input type="checkbox"/> Outro -..... <input type="checkbox"/> Lote/Validade
CICLO UTILIZADO NO TERMOCICLADOR		
Data: / /		
Responsável pela inserção da Reação de PCR no Termociclador:		
Código dos Equipamentos utilizados:		
Ciclos:		

Tempo Total no Termociclador:

ELETROFORESE

Data: / /

Responsável pela Eletroforese:

Código dos Equipamentos utilizados:

Reagentes e Soluções

ITEM	LOTE/ VALIDADE
Água (Destilada, deionizada e autoclavada)	
Agarose	
Tampão TAE	
Brometo de Etídio	

Número / Descrição das Amostras

1- CBE
2- CEE
3- DNA <i>Ladder</i>
4- CBR
5- CP
6- CN
7- Produto de PCR relacionado a Amostra (Matriz)
8- ...

Eletroforese em TAE 1X:

Agarose – 2,0 % (com Brometo de Etídio)

Voltagem (volts) - 88

Tempo (minutos) - 20-25 minutos

Resultado:

Presença do *Amplicon* da praga alvo na Amostra Matriz

Negativo () Positivo ()

Tamanho do *Amplicon* da praga alvo (pb) -

CBE - Negativo () Positivo ()

CEE - Negativo () Positivo ()

CBR - Negativo () Positivo ()

CP - Negativo () Positivo ()

CN - Negativo () Positivo ()

Código da Fotografia do Gel:

Não tirada ()

Local:

Responsável pela análise crítica e conferência dos Resultados (Rubrica):

Data:

9.2. Preparo do Meio de Cultura Batata Dextrose Agar (BDA)

Pesar, em balança analítica, 21g de meio semipronto em recipiente adequado, transferir o material pesado para Becker de 500mL, adicionar 250mL de água destilada e deionizada, fechar a abertura do Becker com filme plástico, aquecer em micro-ondas até a dissolução completa do meio. Retirar o Becker do micro-ondas com a mão protegida em luva de amianto, depositar em placa aquecedora pré-aquecida a 45°C, retirar o filme plástico, completar o volume, com água destilada e deionizada até atingir 500mL, mexer o conteúdo com bastão de vidro, até a dissolução completa do Agar (verificado pela ausência de grânulos de Agar no recipiente de vidro). Distribuir 150mL do meio em Erlenmeyer de 250mL, tampar com algodão hidrofóbico e, esterilizar em autoclave a 121°C por 20 minutos.

9.3. Preparo do Meio de cultura 523 (Kado & Hershkett, 1970)

Pesar 5 g de Sacarose, 2g de Extrato de Levedura, 4g de Caseína hidrolisada, 0,15g de Sulfato de Magnésio, 1g de K₂HPO₄, 7,5g de Agar. Dissolver em micro-ondas, o Agar em 250mL de água destilada e deionizada, depositados em Becker de 500mL, fechando-se a abertura do Becker com filme plástico. Após a dissolução do Agar, retirar o Becker do micro-ondas com a mão protegida em luva de amianto, depositar em placa aquecedora pré-aquecida a 45°C. Retirar o filme plástico, adicionar os outros componentes, completar o volume com água destilada e deionizada para 500mL e homogeneizar com um bastão de vidro. Distribuir 150mL em Erlenmeyer de 250mL, tampar com algodão hidrofóbico e, esterilizar em autoclave a 121°C por 20 minutos.