

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOINFORMÁTICA

DISSERTAÇÃO

Patogenômica para estudos de classificação taxonômica de *Dickeya* spp.

DISCENTE: Mateus Sudario Pereira

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Flávia Figueira Aburjaile

BELO HORIZONTE - MG
2024

Mateus Sudario Pereira

Patogenômica para estudos de classificação taxonômica de *Dickeya* spp.

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioinformática.

BELO HORIZONTE - MG
2024

043

Pereira, Mateus Sudario.

Patogenômica para estudos de classificação taxonômica de *Dickeya* spp.
[manuscrito] / Mateus Sudario Pereira. – 2024.
62 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Flávia Figueira Aburjaile.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Genômica. 3. Doença de planta. 4. Resistência genética.
5. Podridão mole. I. Aburjaile, Flávia Figueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ATA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

Mateus Sudario Pereira

Às nove horas do dia **26 de julho de 2024**, através de videoconferência aplicativo Zoom, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Patogenômica para estudos de classificação taxonômica de *Dickeya spp.***", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Bioinformática**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Flavia Figueira Aburjaile**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Professor(a)/Pesquisador(a)	Instituição	Indicação
Dra. Flavia Figueira Aburjaile	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovado
Dr. José Miguel Ortega	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovado
Dr. Leandro Cardoso Ribeiro	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **Aprovado**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Figueira Aburjaile, Professora do Magistério Superior**, em 26/07/2024, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Jose Miguel Ortega, Servidor(a)**, em 29/07/2024, às 14:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Cardoso Ribeiro, Usuário Externo**, em 30/07/2024, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3406461** e o código CRC **C2E09BAE**.

Referência: Processo no 23072.241296/2024-54 SEI no 3406461

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai e mãe que durante todo esse tempo me apoiaram da melhor maneira.

Aos meus amigos do LBI Diego, Juan, Douglas e Pedro, pela troca de conhecimento e por fazerem daquele ambiente um lugar muito agradável.

Aos meus outros amigos de outros laboratórios e que fazem parte dos “Rangers da Bioinfo”, Bernardo Mirabal e Giovana Fiorini pelas risadas, amizades verdadeiras e bons momentos.

A minha orientadora Dra. Flávia Figueira Aburjaile, por ter me abraçado dentro da bioinformática e me transformado no profissional que sou hoje.

Aos professores da instituição, por serem fonte de grande inspiração.

Aos órgãos de pesquisa que fomentaram este trabalho, principalmente a FAPEMIG por me conceder a bolsa, permitindo assim, o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O gênero *Dickeya* é composto por bactérias Gram-negativas, fitopatogênicas e são um dos principais gêneros causadores da podridão mole em diversas culturas. Estas bactérias podem infectar plantas através de feridas ou aberturas naturais levando ao surgimento dos sintomas, que se caracterizam pela liquefação do tecido das plantas, principalmente órgãos de armazenamento como rizomas, bulbos e tubérculos. Isto apresenta implicações econômicas significativas, afetando os principais produtos agrícolas, como a batata, o milho e até plantas ornamentais, estando entre as dez bactérias fitopatogênicas mais relevantes do mundo. Este trabalho emprega uma abordagem de análise genômica para classificar taxonomicamente dois isolados (CCRMP144 e CCRMP250) de *Dickeya* spp. além de identificar e caracterizar os genes de resistência e virulência da espécie *Dickeya dadantii*. A metodologia utilizou técnicas de bioinformática, incluindo análise de Tetra Correlação (TCS) e Identidade Média de Nucleotídeos (ANI), em associação com uma inferência de árvore filogenômica. Os genes de resistência e virulência foram obtidos através de um alinhamento contra três bancos de dados, sendo eles o CARD para resistência a antibióticos, o BacMet para genes relacionados à resistência a metais pesados e biocidas e o VFDB para identificar os genes de virulência. A metodologia conseguiu confirmar os genomas como pertencentes a espécie *Dickeya dadantii*. Os genes de resistência e virulência foram identificados e caracterizados, expondo os genes centrais, acessórios e exclusivos da espécie. Este estudo demonstrou a eficácia de nossa metodologia para classificação taxonômica e fornece insights sobre a patogênese, o ambiente e adaptabilidade desses isolados que são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de manejo e controle mais eficazes da podridão mole.

Palavras-chave: bioinformática; fitopatógeno; fitopatologia; genômica; podridão mole.

ABSTRACT

The *Dickeya* genus comprises Gram-negative, mesophilic, phytopathogenic bacteria that are among the primary causes of soft rot in various crops. These bacteria can infect plants through wounds or natural openings, leading to the emergence of symptoms that are characterized by the liquefaction of plant tissue, particularly storage organs such as rhizomes, bulbs, and tubers. This has significant economic implications, affecting the main agricultural products, such as potatoes, corn and even ornamental plants, which are among the top 10 most relevant phytopathogenic bacteria. This study employs a genomic analysis approach to taxonomically classify two isolates (CCRMP144 and CCRMP250) of *Dickeya* spp. in addition to identifying and characterizing the resistance and virulence genes of the *Dickeya dadantii* species. The methodology employed bioinformatics techniques, including Tetra Correlation Search analysis (TCS) and Average Nucleotide Identity (ANI), in association with phylogenomic tree inference. Resistance and virulence genes were obtained through an alignment against three databases, CARD for antibiotic resistance, BacMet for genes related to resistance to heavy metals and biocides, and VFDB to identify virulence genes. The methodology successfully characterized the isolates as belonging to the *Dickeya dadantii* species. The identification and characterization of resistance and virulence genes revealed the core, accessory, and exclusive genes of the species. This study demonstrated the effectiveness of our methodology for taxonomic classification and provided insights into the pathogenesis, environment, and adaptability of these isolates, which are crucial for developing more effective soft rot management and control strategies.

Keywords: bioinformatics; phytopathogen; phytopathology; genomics; soft rot.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Gênero <i>Dickeya</i>	10
1.1.1 História Taxonômica	10
1.1.2 Representantes do gênero <i>Dickeya</i>	11
1.2 Principais fitopatologias	15
1.2.1 Podridão mole	15
1.2.2 Cancro da <i>Dickeya</i>	16
1.3 Mecanismos de virulência e patogenicidade	16
1.4 Resistência bacteriana	17
1.4.1 Antibióticos	17
1.4.2 Agrotóxicos	17
1.4.3 Principais mecanismos de resistência das bactérias	17
1.5 Desafios para a saúde coletiva	19
1.6 <i>Dickeya</i> no Brasil	20
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
4. METODOLOGIA E RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO GERAL	40
6. CONCLUSÕES	41
7. PERSPECTIVAS	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Dickeya*

As bactérias do gênero *Dickeya*, pertencentes à família *Pectobacteriaceae*, são Gram-negativas, anaeróbias facultativas, móveis devido à presença de flagelos peritríquios, fermentadoras mesofílicas e capazes de reduzir nitrato a nitrito. Os fitopatógenos deste gênero são conhecidos por serem causadores da podridão mole e podem permanecer assintomáticos em seus hospedeiros por uma ou mais gerações, dificultando o controle da doença (VAN GIJSEGEM; VAN DER WOLF; TOTH, 2021). As espécies de *Dickeya* estão distribuídas globalmente e têm a capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros de importância econômica, como a batata (CZAJKOWSKI *et al.*, 2011), a banana (LIU *et al.*, 2016) e plantas ornamentais, como as orquídeas (BALAMURUGAN *et al.*, 2020).

1.1.1 História Taxonômica

Relatos de bactérias causadoras da podridão mole existem há pelo menos 100 anos, com o primeiro registro oficial datando em 1868. Mesmo antes da criação do gênero *Dickeya*, essas bactérias já eram reconhecidas como agentes patogênicos. Desde então, as espécies pertencentes a esse grupo passaram por várias reclassificações. Em 1920, o *Committee of the Society of American Bacteriologists* introduziu o termo *Erwiniae* para englobar bactérias capazes de degradar substâncias pécticas, as quais foram eventualmente nomeadas *Erwinia carotovora* (WINSLOW *et al.*, 1920). Trinta e três anos depois, em 1953, foi identificada uma nova espécie de bactéria causadora da podridão mole, denominada *Erwinia chrysanthemi*.

Contudo essa classificação ainda era alvo de debate entre os pesquisadores da época, que em alguns casos, propunham associar classificação à sua patogenicidade. Em decorrência dessa discussão o termo patovar, que é usado até hoje, foi criado e acabou dividindo os membros das duas espécies em seis patovares (pv.): pv. *chrysanthemi*, pv. *dianthicola*, pv. *dieffenbachiae*, pv. *parthenii*, pv. *zuae* e pv. *paradisiaca*. Apesar desta divisão, essas bactérias ainda continuam sendo alvo de constante discussão, o que, eventualmente, levou a novas tentativas de classificação por testes sorológicos (sorovar) ou até mesmo por testes bioquímicos (biovar), não sendo conclusivas.

Com o avanço da tecnologia e o surgimento de estudos genômicos mais profundos, como os baseados na sequência 16S do RNA ribossomal, as bactérias *Erwinia* causadoras de podridão mole foram reclassificadas para um novo gênero, *Pectobacterium* (VAN GIJSEGEM; VAN DER WOLF; TOTH, 2021). Finalmente, em 2005 seis espécies foram reclassificadas como gênero *Dickeya* (SAMSON et al., 2005).

Em 2016, foi criada a ordem *Enterobacteriales* o que ajudou a organizar as duas principais famílias causadoras de podridão mole: *Enterobacteriaceae* e *Pectobacteriaceae* (ADEOLU et al., 2016). Devido ao frequente histórico de reclassificações é comum encontrar na literatura o mesmo organismo com diferentes nomenclaturas. Um exemplo é *Pectobacterium chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*), cujas suas espécies foram posteriormente reclassificadas dentro do gênero *Dickeya* (SAMSON et al., 2005), incluindo *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, (agora considerada uma subespécie de *D. dadantii* (BRADY et al., 2012), *D. paradisiaca*, reclassificada como *Musicola paradisiaca* (HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT et al., 2021) e *D. zea*.

1.1.2 Representantes do gênero *Dickeya*

A classificação de novas espécies do gênero *Dickeya* continua sendo tema de discussões na literatura científica, como é o caso da cepa PL65^T, que vem sendo objeto de estudo para sua possível reclassificação como uma nova espécie, denominada *Dickeya colocasiae* (BOLUK et al., 2022). Porém, de acordo com o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), em 2023, um total de 12 espécies deste gênero encontram-se devidamente classificadas até o momento, são elas: *Dickeya aquatica*, *Dickeya chrysanthemi*, *Dickeya dadantii*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya fangzhongdai*, *Dickeya lacustris*, *Dickeya oryzae*, *Dickeya parazeae*, *Dickeya poaceiphila*, *Dickeya solani* e *Dickeya undicola*, *Dickeya zea* (SAYERS et al., 2022).

1.1.2.1 *Dickeya aquatica*

Descrita pela primeira vez em 2014 (PARKINSON et al., 2014), *D. aquática* destaca-se por ser a primeira isolada de ambientes aquáticos de água doce, como rios e canais. Embora ainda escassos, os estudos realizados sobre esta espécie identificaram a presença de fatores de virulência que sugerem seu potencial como fitopatógeno. Um estudo conduzido por Duprey et al. (2019) concluiu que frutos com pH mais ácido, como o pepino e o tomate, podem ser potenciais

hospedeiros de *D. aquática*, sugerindo que essa espécie seja capaz de causar danos a outros tipos de plantas de pH baixo, das quais ainda não existem relatos na literatura científica.

1.1.2.2 *Dickeya chrysanthemi*

Originalmente conhecida como *Erwinia chrysanthemi*, essa foi reclassificada como *Pectobacterium chrysanthemi* e mais recentemente como *D. chrysanthemi* (SAMSON et al., 2005). *D. chrysanthemi* é um patógeno conhecido por causar podridão mole em diversos hospedeiros vegetais, incluindo batatas (DIALLO et al., 2009) e plantas ornamentais, como orquídeas (CATING et al., 2008). Esta espécie tem ampla distribuição geográfica, com registros na América do Norte e do Sul (DAS CHAGAS OLIVEIRA FREIRE; LUIZ MOSCA, 2009), bem como em países com climas temperados, como é o caso da Polônia (SŁAWIAK; ŁOJKOWSKA; VAN DER WOLF, 2009) e Japão (FUJIMOTO et al., 2020).

1.1.2.3 *Dickeya dadantii*

Anteriormente classificada como *Pectobacterium chrysanthemi* e *Brenneria paradisiaca*, *D. dadantii* foi reclassificada em 2005 (SAMSON et al., 2005). Considerada um dos fitopatógenos mais relevantes globalmente (MANSFIELD et al., 2012), essa espécie é amplamente estudada, com a cepa 3937 estabelecida como um modelo em pesquisas de biologia molecular e patogenicidade. A cepa 3937 também demonstrou patogenicidade em pulgões, mesmo sob condições controladas (GRENIER et al., 2006), sugerindo um potencial adaptativo preocupante, especialmente em relação à disseminação por vetores de importância ecológica.

1.1.2.4 *Dickeya dianthicola*

Prevalente na Europa, *D. dianthicola* afeta principalmente culturas de batatas (VAN GIJSEGEM; VAN DER WOLF; TOTH, 2021). Contudo, recentemente, observou-se uma expansão de sua distribuição geográfica, tendo sido relatado na América do Norte (PATEL et al., 2019) e Oceania (WRIGHT et al., 2018). Na Austrália, a introdução dessa espécie pode ter sido consequência do cultivo de dalias em terrenos que posteriormente foram utilizados para o plantio de batatas infectadas (VAN DER WOLF et al., 2021). *D. dianthicola* é frequentemente encontrada com *Dickeya solani* e podem coexistir passivamente em batatas, porém ainda não existem relatos

de coinfeccões. Além disso, existe uma aparente predominância de *D. solani* em relação a *D. dianthicola* que pode ser explicado por uma menor suscetibilidade de *D. solani* aos metabolitos antimicrobianos produzidos por bactérias saprófitas presentes no tecido da batata. Além disso, *D. solani* também possui a capacidade de colonizar mais rápido e de forma mais eficiente do que *D. dianthicola* (CZAJKOWSKI et al., 2013).

1.1.2.5 *Dickeya fangzhongdai*

A *Dickeya fangzhongdai* é considerada uma espécie emergente de fitopatógenos, sendo a primeira do gênero a afetar plantas lenhosas, onde os sintomas incluem necrose em forma de cancro (TIAN et al., 2016). Relatos indicam que ela foi introduzida na Europa por meio de plantas ornamentais (ALIČ et al., 2018). Casos recentes de podridão mole em cebolas na América do Norte também foram atribuídos a essa espécie (MA et al., 2020).

1.1.2.6 *Dickeya lacustris*

Descrita em 2019, *D. lacustris* foi isolada de lagos na França, distantes de áreas agrícolas. Estudos comparativos revelaram que essa espécie compartilha mais semelhanças com *D. dadantii* do que com *D. aquatica*. A nível genômico, há uma diferença significativa na presença de aproximadamente seiscentos genes entre *D. lacustris* e *D. aquatica*. Esses genes são responsáveis por uma maior produção enzimática em *D. lacustris* e não são encontrados em *D. aquatica*. Dentre eles, há genes ortólogos aos de outras bactérias que possuem funções relacionadas a sistemas de toxina/antitoxina, efluxo de arsênico, proteínas associadas à patogênese, metabolismo citrato e enzimas como serina protease, fosfolipase C, endonuclease e exonuclease. Além disso, *D. lacustris* possui uma característica exclusiva presente apenas em *D. paradisiaca*, que é a ausência de um aglomerado de genes que codificam enzimas que proporcionam resistência a estresse oxidativo (HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT; JACOT-DES-COMBES; BRIOLAY, 2019). Sua descoberta como uma nova espécie suscitou a necessidade de investigações adicionais para melhor compreender suas características biológicas. A análise do perfil genômico da *Dickeya lacustris* e a necessidade de criação de um novo biovar realçam a capacidade do gênero de se adaptar a diferentes ambientes e condições.

1.1.1.2.7 *Dickeya oryzae*

Descrita em 2020 como causadora de podridão mole em raízes de arroz na China, *Dickeya oryzae* é geneticamente semelhante a *D. zeae*. Suas características incluem crescimento ideal em pH neutro e 30°C, além da produção de zeamina, uma fitotoxina essencial para a virulência do patógeno. Além disso, a zeamina é um antibiótico natural que também pode ser sintetizado por *Dickeya zeae* e *Serratia plymuthica* (HELLBERG; MATILLA; SALMOND, 2015).

1.1.2.8 *Dickeya parazeae*

Dickeya parazeae foi descrita por Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. (2021) como parte do complexo *zeae*, junto com *D. oryzae* e *D. zeae*. Há poucos relatos dessa espécie, com apenas dois genomas depositados no repositório do NCBI (SAYERS et al., 2022), ressaltando a necessidade de mais estudos.

1.1.2.9 *Dickeya poaceiphila*

Descoberta na Austrália na década de 1950, *Dickeya poaceiphila* foi originalmente classificada como *Pectobacterium carotovorum* NCPPB 569T, mas posteriormente reclassificada após análises genômicas e bioquímicas (HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT et al., 2020). Ela afeta a cana-de-açúcar e gramíneas próximas. 1.1.2.10 *Dickeya solani*

Conhecida por causar podridão mole em batatas, *Dickeya solani* é extremamente agressiva, mais virulenta que *D. dianthicola* e predominante em altas temperaturas (CZAJKOWSKI et al., 2013). Sua introdução na Europa pode ter ocorrido através de plantas ornamentais (VAN GIJSEGEM; VAN DER WOLF; TOTH, 2021).

1.1.2.10 *Dickeya undicola*

Identificada em ambientes de água doce na Ásia e Europa, *Dickeya undicola* é próxima a *D. fangzhongdai*, mas distingue-se pela capacidade de utilizar ácido d-galactônico- γ -lactona como única fonte de carbono. Ela causa maceração em batatas e cebolas (OULGHAZI et al., 2019). 1.1.2.12 *Dickeya zeae*

Dickeya zeae é uma das espécies mais amplamente distribuídas do gênero, causadora de podridão mole em várias culturas de interesse econômico, como abacaxi (YOUNG et al., 2022), arroz e banana (HU et al., 2018).

Notavelmente, *D. zea* produz dois poliaminoácidos, zeamina I e zeamina II, com atividade antibiótica e fitotóxica, que ainda são alvo de muitos estudos. Suas propriedades ainda não foram completamente compreendidas. Entretanto, alguns estudos já sugerem que a zeamina tem propriedades fungicidas e até mesmo nematicidas (HELLBERG; MATILLA; SALMOND, 2015).

1.2 Principais fitopatologias

1.2.1 Podridão mole

A principal característica da manifestação desta doença é a liquefação do tecido da planta, principalmente órgãos de armazenamento como tubérculos, rizoma e bulbos, na maioria dos casos sendo fatal para a planta (CHARKOWSKI, 2018). Esse processo é mediado por um grupo de enzimas chamadas pectinases, que hidrolisam a pectina — um heteropolissacarídeo encontrado entre a lamela média e a parede celular primária das plantas. A transmissão das bactérias causadoras da podridão mole pode ocorrer por meio de água ou equipamentos contaminados, durante a propagação das plantas, no transporte ou na armazenagem (SHARMA; RATHORE; SHARMA, 2013).

De acordo com a pesquisa realizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a podridão mole ocorre com mais frequência em períodos de colheita que coincidem com estações quentes e chuvosas. Além disso, constatou-se que a agressividade da doença aumenta em temperaturas superiores a 25°C (“Podridão mole - Portal Embrapa”, [s.d.]). Isso pode ser explicado pela maior estabilidade da atividade pectinolítica em torno de 30°C, bem como pela disseminação facilitada da bactéria em ambientes aquáticos contaminados (BIZ et al., 2014).

O controle da podridão mole representa um desafio significativo, uma vez que não há estratégias de manejo completamente eficazes. Entre as principais medidas recomendadas para atenuar a incidência da podridão mole, destacam-se a prática de rotação de culturas, a aplicação de compostos à base de cobre, o emprego de técnicas de refrigeração e a minimização de ferimentos nas plantas hospedeiras (GAMA et al., 2016).

1.2.2 Cancro da *Dickeya*

Embora *Dickeya dadantii* seja amplamente conhecida por causar podridão mole, estudos recentes indicam que ela também é o agente etiológico do cancro da macieira (*Malus pumila*) (OGOSHI et al., 2019). Os sintomas dessa fitopatologia incluem exsudação bacteriana abundante em feridas causadas por poda, colonização e descoloração da medula do caule e dos vasos condutores, além da murcha das folhas, frequentemente resultando na morte da planta.

Ainda que existam poucos estudos sobre essa fitobacteriose específica causada por *D. dadantii*, há relatos de *Dickeya fangzhongdai*, outra espécie do mesmo gênero, como responsável por cancro em pereiras (*Pyrus pyrifolia* L.). Identificada primeiramente na China, *D. fangzhongdai* foi até então a única bactéria conhecida a causar patogenias em plantas lenhosas, apresentando sintomas similares aos causados por *D. dadantii*, com exsudação bacteriana e alta letalidade (CHEN et al., 2020).

1.3 Mecanismos de virulência e patogenicidade

Dentre os mecanismos que contribuem para a patogênese em *Dickeya* destaca-se os seus fatores de virulência eficazes. Esses podem ser descritos como moléculas que auxiliam as bactérias a colonizarem seus hospedeiros, participando de diferentes fases da infecção, como adesão às células hospedeiras, evasão do sistema imunológico, aquisição de nutrientes essenciais e danos aos tecidos do hospedeiro.

A expressão dos fatores de virulência pode variar entre diferentes cepas de um mesmo agente patogênico, resultando em níveis variáveis de patogenicidade, dependendo do hospedeiro infectado (patovar) (RAHME et al., 1995; SHARMA et al., 2017). Tal variabilidade pode ser influenciada por mutações genéticas e por processos de transferência horizontal de genes, o que torna essencial o estudo desses fatores para entender a patogenicidade das bactérias e desenvolver estratégias eficazes de prevenção e controle (CROSS, 2008).

1.4 Resistência bacteriana

1.4.1 Antibióticos

O uso inapropriado de antibióticos tem gerado consequências globais, sendo alvo de um número crescente de estudos que associam seu consumo à emergência de bactérias multirresistentes, incluindo o uso de antibióticos em animais (BELL et al., 2014; COSTELLOE et al., 2010; SINGER et al., 2003). As bactérias desenvolveram diversas estratégias para adquirir resistência a antibióticos, geralmente em resposta à pressão seletiva exercida por essas substâncias no ambiente. Através de alterações genômicas, elas podem produzir proteínas que conferem resistência específica. Além disso, muitas bactérias possuem múltiplos mecanismos de resistência simultaneamente, tornando-se multirresistentes, e têm a capacidade de transferir esses mecanismos para outras espécies por meio de transferência horizontal de genes (PETERSON; KAUR, 2018).

1.4.2 Agrotóxicos

De maneira semelhante, o uso de agrotóxicos tem sido associado ao surgimento de bactérias multirresistentes, e essa questão é constantemente debatida na comunidade científica. A exposição contínua a agrotóxicos pode selecionar bactérias resistentes a esses compostos, que também podem apresentar resistência cruzada a antibióticos com mecanismos de ação molecular semelhantes. Esse fenômeno é explicado pela transferência de aglomerados de genes de resistência, que podem incluir tanto genes de resistência a agrotóxicos quanto a antibióticos. Alguns estudos sugerem que a exposição a agrotóxicos pode aumentar a frequência de mutações genéticas em bactérias, favorecendo o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência (RANGASAMY et al., 2017, 2018).

1.4.3 Principais mecanismos de resistência das bactérias

As bactérias podem desenvolver resistência a pesticidas e outros agentes antimicrobianos por meio de diversos mecanismos, incluindo mutações genéticas e transferência horizontal de material genético entre diferentes espécies. Entre os mecanismos mais comuns de resistência estão os sistemas de efluxo. Nesses sistemas, proteínas transportadoras atuam como bombas, utilizando energia proveniente da hidrólise de ATP ou do gradiente de prótons para expulsar compostos indesejados da célula bacteriana, como metais pesados, como o cobre, frequentemente utilizado

em pesticidas (WILLIS; BISHOP, 2016), e antibióticos, como as fluoroquinolonas, que são eficazes contra enterobactérias (WOLFSON; HOOPER, 1989). Os sistemas de efluxo são classificados em diferentes classes, cada uma com uma característica distinta. Um exemplo é o sistema encontrado em *D. zea*, que confere resistência a uma classe incomum de antibióticos chamada zeaminas, em homenagem a espécie em que foi descoberto (LIANG et al., 2019; POOLE, 2007).

Além dos sistemas de efluxo, outros mecanismos de resistência envolvem a modificação de antibióticos por meio da ação de grupos específicos de enzimas, como as fosfotransferases (PPTs), que são essenciais para a virulência de *D. zea* (CHENG et al., 2016). Em outras bactérias, como *Staphylococcus aureus*, as transferases são responsáveis pela adição de grupos químicos a antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, o que afeta a síntese proteica bacteriana (MAHDIYOUN et al., 2016; PETERSON; KAUR, 2018). Esse mecanismo de modificação enzimática desempenha um papel crucial na resistência de várias bactérias a antibióticos.

Outro mecanismo importante de resistência envolve a degradação de antibióticos pela produção de enzimas que os inativam antes de entrarem na célula. Um exemplo notório são as β -lactamases, enzimas que hidrolisam antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina. Bactérias como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são bem documentadas por apresentar esse tipo de resistência (COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000).

Adicionalmente, algumas bactérias utilizam o sequestro de antibióticos como estratégia de resistência. Esse mecanismo envolve proteínas que se ligam aos antibióticos, impedindo que eles atinjam seus alvos bacterianos. As bactérias também podem alterar alvos específicos dos antibióticos, modificando a estrutura ou a função dos mesmos dentro da célula, o que previne a ligação do antibiótico ou sua interferência nos processos bacterianos. Um exemplo recente é a descoberta de genes em *Dickeya dadantii* que conferem resistência a peptídeos antimicrobianos (AMPs) (PANDIN; CAROFF; CONDEMINE, 2016). No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre os mecanismos de resistência em representantes desse gênero, pois muitos sistemas ainda não foram completamente compreendidos.

1.5 Desafios para a saúde coletiva

O uso inadequado de agrotóxicos pode gerar sérias consequências para a saúde coletiva. O uso excessivo ou o descarte incorreto dessas substâncias cria pressões seletivas sobre as populações bacterianas, resultando em um desequilíbrio nas comunidades microbianas e, conseqüentemente, no surgimento de microrganismos multirresistentes e mais virulentos, incluindo aqueles que não eram os alvos principais dos pesticidas (RANGASAMY et al., 2017).

De forma semelhante, a aplicação de antibióticos ao solo junto com esterco provoca um aumento significativo na abundância e na transferência de genes de resistência. Esses antibióticos, embora causem apenas alterações temporárias na estrutura e no funcionamento das comunidades microbianas do solo, têm efeitos notáveis na rizosfera, onde a dissipação de antibióticos e a transferência de genes de resistência são intensificadas. A liberação contínua de antibióticos sequestrados para a água do solo prolonga sua biodisponibilidade, amplificando o impacto ambiental e facilitando a disseminação da resistência antimicrobiana (JECHALKE et al., 2014).

O conceito de Saúde Única, que integra a saúde humana, animal e ambiental, é essencial para compreender os impactos do uso inadequado de agrotóxicos e antibióticos. O uso indiscriminado dessas substâncias não apenas contamina o meio ambiente, mas também exerce pressão seletiva sobre populações microbianas, promovendo o surgimento de organismos resistentes. Esse fenômeno é particularmente preocupante com relação a bactérias multirresistentes, que podem afetar tanto animais quanto humanos. A pandemia de COVID-19, embora causada por um vírus, destacou a importância de abordar questões de saúde de forma integrada, já que a resistência antimicrobiana poderia agravar crises de saúde pública futuras. Em bactérias, esse processo é ainda mais preocupante devido à presença de elementos genéticos móveis, como as ilhas de patogenicidade e plasmídeos, que são alvos de constantes mutações e facilitam a transferência horizontal desses genes (DOBRINDT et al., 2004; RODRÍGUEZ-BELTRÁN et al., 2021).

Quando essas bactérias multirresistentes e mais virulentas entram em contato com plantas, humanos ou animais, elas podem causar infecções mais virulentas e difíceis de se tratar, aumentando o risco de complicações de saúde, morte, além de prejuízos ambientais e econômicos. Até o momento, não existem evidências na literatura de bactérias do gênero *Dickeya* sejam patogênicas para os seres humanos ou outros animais, apenas em casos específicos como relatado por Grenier et al. (2006)), que demonstrou a capacidade de *D. dadantii* em ser patogênica em pulgões.

1.6 *Dickeya* no Brasil

O Brasil é um país conhecido mundialmente por sua vasta extensão territorial e por sua destacada atuação no setor agropecuário, sendo um dos maiores produtores e exportadores de *commodities* agrícolas do mundo, o que contribui significativamente para a economia do país. De acordo com o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), somente em 2021 as exportações do agronegócio brasileiro somaram valor recorde movimentando 120,59 bilhões de dólares (“Agro do Brasil no Mundo”, [s.d.]). O agronegócio é uma importante fonte de renda para o país, representando uma grande parcela do Produto Interno Bruto (PIB) e empregando milhões de pessoas em todo o território nacional.

Embora o gênero *Dickeya* ainda seja pouco estudado no Brasil, há uma escassez de dados detalhados sobre seus possíveis hospedeiros no país e as consequências econômicas associadas. . No entanto, *Dickeya* representa uma ameaça para a agricultura brasileira devido à sua capacidade em afetar diversas culturas economicamente importantes para o país, como o milho, batata, banana, batata-doce e arroz, além de plantas ornamentais como a babosa, cactos e violetas, entre outros (CARDOZA; DUARTE; LOPES, 2017; GUAN et al., 2020; MA et al., 2007). A infecção por este patógeno pode resultar na redução da qualidade dos produtos agrícolas e, conseqüentemente, em perdas significativas de colheitas.

2. JUSTIFICATIVA

A podridão mole é uma fitobacteriose de grande importância, frequentemente causada por bactérias da espécie *D. dadantii*. Esta doença é notoriamente letal na maioria dos casos e, até o momento, carece de um método de controle eficaz tornando a prevenção a estratégia mais viável para o manejo da enfermidade. Bactérias do gênero *Dickeya* são organismos mesofílicos e saprófitos, o que contribui para sua incidência recorrente, especialmente em regiões de clima tropical, como o Brasil.

Dado seu amplo espectro de hospedeiros de interesse econômico, a podridão mole causa grandes prejuízos à economia brasileira. Além disso, investigações recentes confirmaram a participação de *D. dadantii* no desenvolvimento de cancro em hospedeiros lenhosos o que reforça a necessidade de uma compreensão mais aprofundada de seu potencial fitopatogênico, que ainda permanece parcialmente elucidado.

As análises bioinformáticas propostas neste estudo podem confirmar e complementar outros tipos de análises moleculares. Ao comparar diferentes linhagens, essas análises ajudam a classificar com precisão os isolados e auxiliam na identificação das regiões brasileiras afetadas pela podridão mole, especialmente ao usar dados de genoma completo para garantir uma classificação mais precisa. Além disso, o conhecimento detalhado do viruloma e resistoma da espécie contribui para a compreensão das linhagens a nível individual, auxiliando na identificação de linhagens resistentes e/ou mais virulentas por meio da correlação entre seus repertórios em uma perspectiva global.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Classificar taxonomicamente e realizar uma análise comparativa de dois isolados de *Dickeya* spp. provenientes do estado de Pernambuco.

3.2 Objetivos Específicos









- ✓ Sequenciar, montar e anotar os genomas dos dois isolados de *Dickeya* spp.;
- ✓ Classificar os isolados com base em análises genômicas;
- ✓ Identificar e caracterizar o viruloma e o resistoma dos isolados.

4. METODOLOGIA E RESULTADOS

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos neste trabalho, esta seção será apresentada em formato de artigo científico publicado na revista “Taxonomy” da MDPI. O artigo apresenta uma abordagem abrangente sobre a patogenômica e classificação taxonômica de *Dickeya*. Também serão apresentados métodos para a confirmação da espécie por taxogenômica, além da avaliação do viruloma e resistoma da espécie.

Article

Beyond the Basics: Taxonomic Classification and Pathogenomics in Recently Discovered *Dickeya dadantii* Isolates

Mateus Sudario Pereira ¹, Diego Lucas Neres Rodrigues ¹, Juan Carlos Ariute ¹,
Douglas Vinícius Dias Carneiro ¹, Pedro Alexandre Sodrzeieski ¹, Marco Aurélio Siqueira Gama ²,
Elineide Barbosa de Souza ², Vasco Azevedo ³, Bertram Brenig ⁴, Ana Maria Benko-Iseppon ⁵
and Flavia Figueira Aburjaile ^{1,*}

- ¹ Preventive Veterinary Medicine Department, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil; msudario25@gmail.com (M.S.P.); diego.neresr@gmail.com (D.L.N.R.); jcarlosariute@gmail.com (J.C.A.); dougbuick@gmail.com (D.V.D.C.); pedroasod@gmail.com (P.A.S.)
- ² Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 52171-900, Pernambuco, Brazil; mas.gama@yahoo.com.br (M.A.S.G.); elineide.souza@ufrpe.br (E.B.d.S.)
- ³ Genetics, Ecology and Evolution Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil; vascoariston@gmail.com
- ⁴ Institute of Veterinary Medicine, University Göttingen, 37077 Göttingen, Germany; brenig@gwdg.de
- ⁵ Genetics Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50740-600, Pernambuco, Brazil; ana.iseppon@gmail.com
- * Correspondence: faburjaile@gmail.com

Abstract: The genus *Dickeya* consists of Gram-negative bacteria capable of causing soft rot symptoms in plants, which involves tissue breakdown, particularly in storage organs such as tubers, rhizomes, and bulbs. These bacteria are ranked among the top ten most relevant phytopathogens and seriously threaten economically valuable crops and ornamental plants. This study employs a genomic analysis approach to taxonomically classify and characterize the resistome and virulome of two new strains, CCRMP144 and CCRMP250, identified as *Dickeya dadantii*. These strains were found to be the causative agents of soft rot symptoms in chili pepper (*Capsicum* spp.) and lettuce (*Lactuca sativa*), respectively, in the northeastern region of Brazil. The methodology employed in silico techniques, including tetra correlation search (TCS) and Average Nucleotide Identity (ANI) analysis, in association with a phylogenomic tree inference. TCS and ANI analysis showed that the studied strains belong to the *Dickeya dadantii* species. The phylogenomic analysis grouped the studied strains in the *D. dadantii* clade. The genomic characterization demonstrates 68 virulence genes, 54 resistances of biocide and heavy metal genes, and 23 antibiotic resistance genes. As far as we know, this is the first genomic study with Brazilian *D. dadantii* strains. This study demonstrates the efficacy to taxonomic classification and provides insights into the pathogenesis, host range, and adaptability of these strains which are crucial for the development of more effective management and control strategies for soft rot diseases.

Keywords: genomic; plant pathogen; resistome; soft rot; taxogenomic; virulome



Citation: Pereira, M.S.; Rodrigues, D.L.N.; Ariute, J.C.; Carneiro, D.V.D.; Sodrzeieski, P.A.; Gama, M.A.S.; de Souza, E.B.; Azevedo, V.; Brenig, B.; Benko-Iseppon, A.M.; et al. Beyond the Basics: Taxonomic Classification and Pathogenomics in Recently Discovered *Dickeya dadantii* Isolates. *Taxonomy* **2024**, *4*, 696–712. <https://doi.org/10.3390/taxonomy4040036>

Academic Editor: Liwei Zhou

Received: 23 May 2024

Revised: 11 September 2024

Accepted: 18 September 2024

Published: 30 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bacteria belonging to the *Dickeya* genus are Gram-negative, facultative anaerobes that possess peritrichous flagella and are usually motile. These microorganisms are also mesophilic fermenters, capable of reducing nitrate to nitrite and are primarily phytopathogens causing soft rot in their hosts [1]. Phytopathogens of the family *Pectobacteriaceae*, which includes the genus *Dickeya*, can remain asymptomatic for several generations, making disease control difficult [2]. *Dickeya* species have a global distribution and can infect a wide range of hosts, encompassing economically important crops such as potato (*Solanum*

tuberosum), rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), pineapple (*Ananas comosus*), banana (*Musa* spp.), and even orchids such as Vanda (*Vanda* spp.) and vanilla (*Vanilla planifolia*) [3]. While most isolates come from infected plants, they can also be found in aquatic ecosystems, in aerosols washed by rain, on contaminated machinery, and at harvest [2].

After undergoing multiple reclassifications, Samson et al. (2005) [1] classified members of *Pectobacterium chrysanthemi* (formerly known as *Erwinia chrysanthemi*) into the genus *Dickeya*. Initially, six species were classified: *Dickeya chrysanthemi*, *Dickeya dadantii*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya dieffenbachiae* (now a subspecies of *D. dadantii* [4]), *Dickeya paradisiaca* (reclassified as *Musicola paradisiaca* [5]), and *Dickeya zeae*. As documented by the National Center for Biotechnology Information (NCBI), a total of twelve species of this genus have been identified until April 2023, including *Dickeya aquatica*, *Dickeya chrysanthemi*, *Dickeya dadantii*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya fangzhongdai*, *Dickeya lacustris*, *Dickeya oryzae*, *Dickeya parazeae*, *Dickeya poaceiphila*, *Dickeya solani*, *Dickeya undicola*, and *Dickeya zeae* [6].

This pathology is characterized by the liquefaction of plant tissues, particularly storage organs such as tubers, rhizomes, and bulbs, often leading to the death of the plant. The main mechanism of soft rot is caused by plant cell wall degrading enzymes, mainly pectate lyases, which hydrolyze pectin, a heteropolysaccharide found between the middle lamella and the primary cell wall of plants [3]. They spend most of their parasitic life in the apoplasts of their hosts [7]. However, they have also been found on leaves where they can live as epiphytes [7]. Soft rot bacteria can infect other plants through wounds and natural openings such as stomata [2]. Infection can be transmitted to nearby plants through processes involving contaminated water or equipment, which can occur during activities such as plant propagation, transport, and storage [7].

The devastating effects of SRP are particularly evident during outbreaks, such as the one in 2014, which severely impacted potato crops across the United States and several other countries [8]. The Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) reports that the disease is more prevalent during harvest periods that coincide with hot and rainy seasons [9]. The aggressiveness of SRP increases at temperatures above 25 °C due to the stability of pectinolytic activity at temperatures close to 30 °C [10], making it a major threat to tropical countries such as Brazil. These factors have contributed to making *Dickeya* one of the ten most important phytopathogenic bacteria [11].

The genus *Dickeya* has been the subject of relatively few studies, with fewer than 200 genomes available at NCBI at the time of this research. This study aims to perform a taxonomic classification of two new *Dickeya* isolates, CCRMP144 and CCRMP250, obtained from infected chili pepper (*Capsicum annuum*) and lettuce (*Lactuca sativa*), respectively, in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. Furthermore, it seeks to characterize their set of virulence factors (virulome) and the set of genes that confer resistance to antibiotics or other antimicrobial agents (resistome). By elucidating their virulome and resistome, this research aims to establish a foundation for more targeted and efficient strategies to manage this pathogen and safeguard global agricultural production.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation, Genomes Database, and Sequencing Data

This study employed a dataset consisting of 199 genomes (see Table S10), which included two newly isolated strains. The first strain, CCRMP144, was derived from infected sweet pepper (*Capsicum annuum*) in the city of Chã Grande (8.23255 S, 35.4619 W), while the second strain, CCRMP250, was obtained from infected lettuce (*Lactuca sativa*) in Vitória de Santo Antão (8.1263 S, 35.3075 W), both obtained in the state of Pernambuco, Brazil.

The bacterium was selectively isolated by transferring rotting tissue onto a healthy bell pepper fruit using a sterilized stick [12]. After incubating the fruit in a humid chamber for 24 h, the bacteria were directly transferred from the lesions to petri dishes containing CPG medium (1 g of hydrolyzed casein, 10 g of peptone, 10 g of glucose, 18 g of agar, and sterile distilled water (SDW) to a final volume of 1000 mL). In this medium, young colonies of pectobacteria, (after 24 h), exhibited a “broken glass” appearance when observed

under a stereoscope with oblique lighting [13]. Furthermore, the strains were tested for pathogenicity on hosts including cabbage leaves, bell pepper fruits, potato tubers, and Chinese cabbage leaves. Six samples of each host were inoculated with 10 μ L of a cell suspension (10^7 CFU/mL). After 24 to 48 h of incubation at 28 °C in a humid chamber, typical soft rot symptoms were observed, and the strains were successfully re-isolated from symptomatic zucchini fruits, thereby completing Koch's postulates. The isolates were then preserved in SDW, lyophilized, and stored in the Rosa Mariano Culture Collection (CCRM) of the Phytobacteriology Laboratory (LAFIBAC) at the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) [14].

After that, the DNA was extracted with the MiniPrep kit for bacterial genomic DNA extraction (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. The DNA was quantified by Nanodrop and then submitted to library preparation. The sequencing was conducted on the Hi-Seq 2500 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) using a paired-end library of 2×150 bp. Furthermore, the remaining 197 genomes were obtained from the public genome repository of the National Center for Biotechnology (NCBI) [6]. All available genomes (until 18 April 2023) were used to create the database.

2.2. Quality Control, Assembly, and Annotation

Sequencing quality was evaluated using the FastQC tool (v0.11.9) [15]. Adapters were removed from CCRMP144 and CCRMP250 strains using AdapterRemoval v2.3.3 software [16] with default values. Finally, the genomes were assembled using the Unicycler tool (v0.4.8) [17] with default settings.

To ensure assembly quality, QUAST software was utilized with default parameters [18]. The assembled sequences were deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database under the following BioProject ID: PRJNA1010767. Furthermore, BUSCO v5.2.2 [19] analyzed a total of 199 genomes, including the two new isolates and NCPPB 898 and DSM 18020, which are two distinct designations of the type strain. The compiled data were compared with the enterobacterales_odb10 database. Assemblies with four or fewer missing genes (99.09% completeness or higher) were then selected for the main database. To avoid any annotation bias [20], all the genomes that successfully passed the completeness test underwent annotation via Rapid Prokaryotic Genome Annotation (PROKKA v.14.6) with default parameters [21]. All subsequent analyses were based on the resulting files generated by Prokka.

2.3. Taxonomic Classification

Species identification was achieved through a multi-step pipeline. First, the isolates went through a tetra correlation search (TCS) using the JSpeciesWS [22] to provide initial insights into phylogenomics while concurrently imposing minimal computational processing demands because it is alignment free [23].

Subsequently, we performed an Average Nucleotide Identity (ANI) using the MUMmer alignment method (ANIm) of pyANI (0.2.12) with a stringent threshold of >95%. The MUMmer algorithm was chosen for its computational efficiency over ANIb [24]. Finally, a phylogenetic tree was constructed from the genome dataset using the hybrid methodology gene method implemented by OrthoFinder (2.5.4) [25]. We used the whole dataset of genomes along with an outgroup of *Pectobacterium atrosepticum* (strain 21a) that was included to serve as the root for the phylogenetic analysis. This process was performed by using MSA (Multiple Sequence Alignment) algorithm for gene tree inference and default settings. The MSA method was selected rather than the default dendroBLAST, due to its superior accuracy, which is achieved through the use of maximum likelihood [26]. To visualize the genomic tree, we utilized the iTOL and the FigTree platforms [27,28].

2.4. Pan Analyses

Pan analyses were conducted using PanviTa [29] with the *D. dadantii* genomes. The software uses DIAMOND-BLASTp to align the predicted proteome with the CARD [30], BacMet [31], and VFDB [32] databases filtering the results based on the specified identity and coverage parameters, set at 70% identity and 70% coverage by default parameters.

3. Results

3.1. Quality Control and Standardization of the Dataset

After the trimming processes, a total of 15283716 sequences were found for CCRMP144 and 12017356 for CCRMP250. Quality control revealed that the N50 values for CCRMP144 and CCRMP250 were high, at 162961 and 187352, respectively, indicating that at least 50% of the nucleotides are located in contigs of that size or larger. As expected for high-quality assemblies, the L50 values were as low as 10 for CCRMP144 and 8 for CCRMP250. In addition, the GC content and genome size were consistent with the predicted values for the reference 3937 strain [33]. Additional information is provided in Table S1.

The sequenced genomes of CCRMP144 and CCRMP250 were deposited in the NCBI with the following accession numbers (JAVIJR000000000 and JAVIJQ000000000), respectively. From the initial 199 genomes analyzed (Table S3), 13 were excluded for not meeting the minimum completeness threshold of four or fewer missing genes, as assessed by BUSCO (Table S2). Of these excluded genomes, nine belonged to *D. dadantii*. The remaining 186 genomes, including two newly identified isolates, met the 99.09% completeness standard (four or fewer missing genes), as detailed in Table S3. All genomes were annotated by Prokka tool.

3.2. Taxogenomics of the Species and Its Evolutionary Relationships

3.2.1. First Insights into CCRMP144 and CCRMP250 Isolates

The clipping of the proximity identification analysis of strains CCRMP144 and CCRMP250 with other strains is shown in Table 1. It shows a Z-score of 100% between the isolates and a significant proximity between them and the 13 other strains of the *Dickeya* genus. Detailed tetra correlation search results are presented in Table S4 for strain CCRMP144 and Table S5 for strain CCRMP250.

Table 1. A cross-section of tetra correlation search values with the two strains studied. Showing the nearby species, strains referring to the species, the family to which they belong, and the Z-score of the two strains.

Species	Strain	Family	Z-Score CCRMP144	Z-Score CCRMP250
<i>Dickeya</i> spp.	CCRMP144	<i>Pectobacteriaceae</i>	1	1
<i>Dickeya</i> spp.	CCRMP250	<i>Pectobacteriaceae</i>	1	1
<i>Dickeya dadantii</i>	3937	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99980	0.99980
<i>Dickeya dadantii</i> subsp. <i>dieffenbachiae</i>	NCPPB 2976	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99966	0.99965
<i>Dickeya fangzhongdai</i>	M005	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99905	0.99904
<i>Dickeya fangzhongdai</i>	M074	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99903	0.99903
<i>Dickeya fangzhongdai</i>	ND14b	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99903	0.99903
<i>Dickeya fangzhongdai</i>	CGMCC1.15464	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99894	0.99894
<i>Dickeya fangzhongdai</i>	DSM101947	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99893	0.99893
<i>Dickeya solani</i>	Ds0432-1	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99887	0.99887
<i>Dickeya solani</i>	IPO2222	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99881	0.99881
<i>Dickeya solani</i>	IPO2222	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99879	0.99879
<i>Dickeya dianthicola</i>	NCPPB453	<i>Pectobacteriaceae</i>	0.99681	0.99682

Table 1 shows that the strains studied were part of the genus *Dickeya*, but with several related species. This study continued with an ANI analysis between the two strains and the other strains in Table S3. The heatmap with the results of the ANI analysis is shown in Figure S1. The respective values from Figure S1 are also shown in Table S6. The main collapsed values between the species are shown in Table 2.

Table 2. Average ANI values per species compared to the strains studied. The strains have been collapsed by species and the values are mirrored.

Strains	CCRMP144	CCRMP250	<i>D. dadantii</i>	<i>D. solani</i>	<i>D. fangzhongdai</i>	<i>D. dianthicola</i>	<i>D. undicola</i>	<i>D. chrysanthemi</i>	<i>D. poaceiphila</i>	<i>D. zeae</i>	<i>D. parazeae</i>	<i>D. oryzae</i>	<i>D. lacustris</i>
CCRMP144	1.000												
CCRMP250	1.000	1.000											
<i>D. dadantii</i>	0.976	0.976	1.000										
<i>D. solani</i>	0.942	0.942	0.942	1.000									
<i>D. fangzhongdai</i>	0.925	0.925	0.925	0.927	1.000								
<i>D. dianthicola</i>	0.922	0.922	0.922	0.922	0.922	1.000							
<i>D. undicola</i>	0.896	0.896	0.893	0.896	0.918	0.893	1.000						
<i>D. chrysanthemi</i>	0.881	0.881	0.880	0.877	0.877	0.880	0.866	1.000					
<i>D. poaceiphila</i>	0.872	0.872	0.873	0.871	0.873	0.874	0.863	0.872	1.000				
<i>D. zeae</i>	0.865	0.865	0.864	0.863	0.864	0.865	0.859	0.873	0.870	1.000			
<i>D. parazeae</i>	0.865	0.865	0.865	0.863	0.864	0.866	0.859	0.874	0.870	0.955	1.000		
<i>D. oryzae</i>	0.864	0.864	0.873	0.862	0.863	0.866	0.860	0.872	0.871	0.957	0.945	1.000	
<i>D. lacustris</i>	0.849	0.848	0.848	0.845	0.847	0.848	0.845	0.851	0.848	0.850	0.852	0.850	1.000

Table 2 shows that strains CCRMP144 and CCRMP250 are present in the cluster of *D. dadantii* strains, with percentage identity values above 95%. The analysis showed 10 different clusters (Figure S1). Respective to each species present in the analysis, it was observed that the *D. dadantii* group was distinctly separated from other species, in contrast to the species of the *D. zeae* complex, *D. zeae*, *D. oryzae*, and *D. parazeae*, which are shown in two different groups. Both isolates are presented within the *D. dadantii* species.

3.2.2. Orthologue Analysis of CCRMP144 and CCRMP250 Isolates

After statistical similarity analysis by ANI, phylogenomic analysis followed. Figure 1 illustrates the phylogenomic tree which used the presence of orthologous genes as a metric. Monophyletic clades were collapsed into a single branch referring to the species. Figure S2 shows the complete phylogenomic tree.

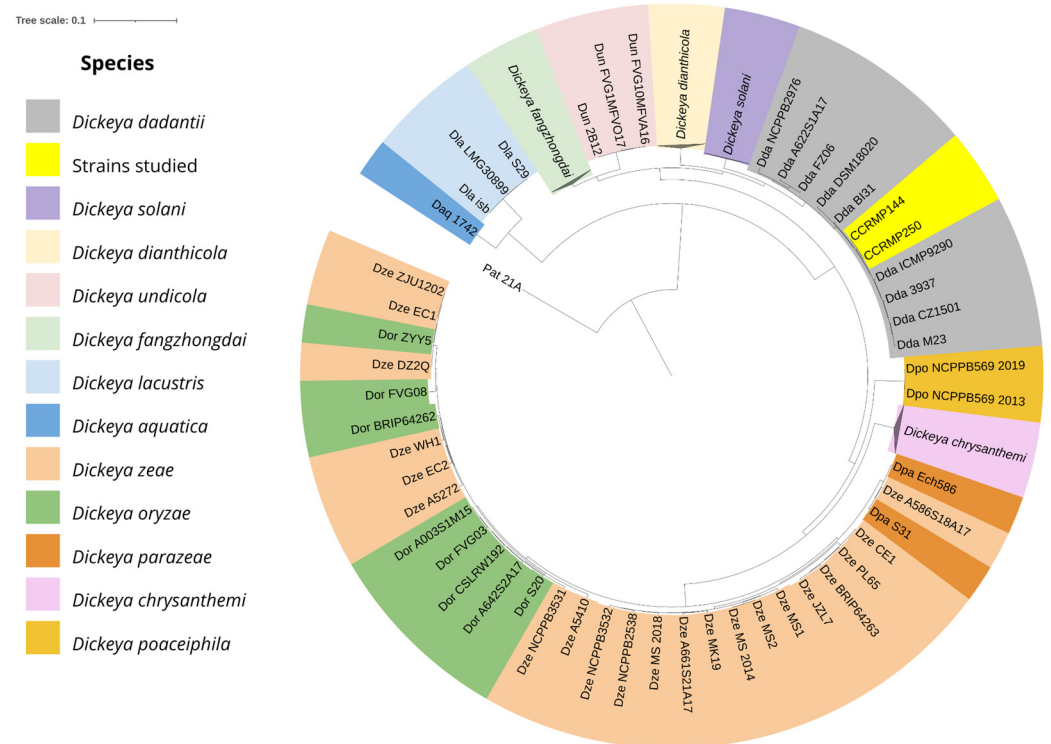


Figure 1. Collapsed phylogenomic tree inference using orthologues. Rooted maximum likelihood phylogeny of the 186 *Dickeya* strains. Monophyletic clades of *D. fangzhongdai*, *D. dianthicola*, *D. solani*, and *D. chrysanthemii* were collapsed into single species branch. Each species is denoted by a distinct color. The *Pectobacterium atrosepticum* (Pat_21A) was used as an outgroup. The strains CCRMP144 and CCRMP250 are highlighted in yellow.

The tree shows convergent results with Figure S1. Strains CCRMP144 and CCRMP250 are present in the same clade of *D. dadantii* strains. These results indicate that the strains can be classified as *D. dadantii*. Most of the clades are monophyletic, with clear separations between species. However, the phylogenomic tree also revealed the presence of the *D. zeae* complex, characterized by non-monophyletic clades in which several species share the same branch.

3.3. Analysis of Shared Genes Reveals the Pathogenic Potential of the Species

3.3.1. Virulome

The *D. dadantii* virulome consists of 68 genes. These genes are involved in various processes, including motility, effector delivery systems, immune modulation, regulation,

adherence, antimicrobial activity/competitive advantage, and biofilm production as shown in Figure 2.

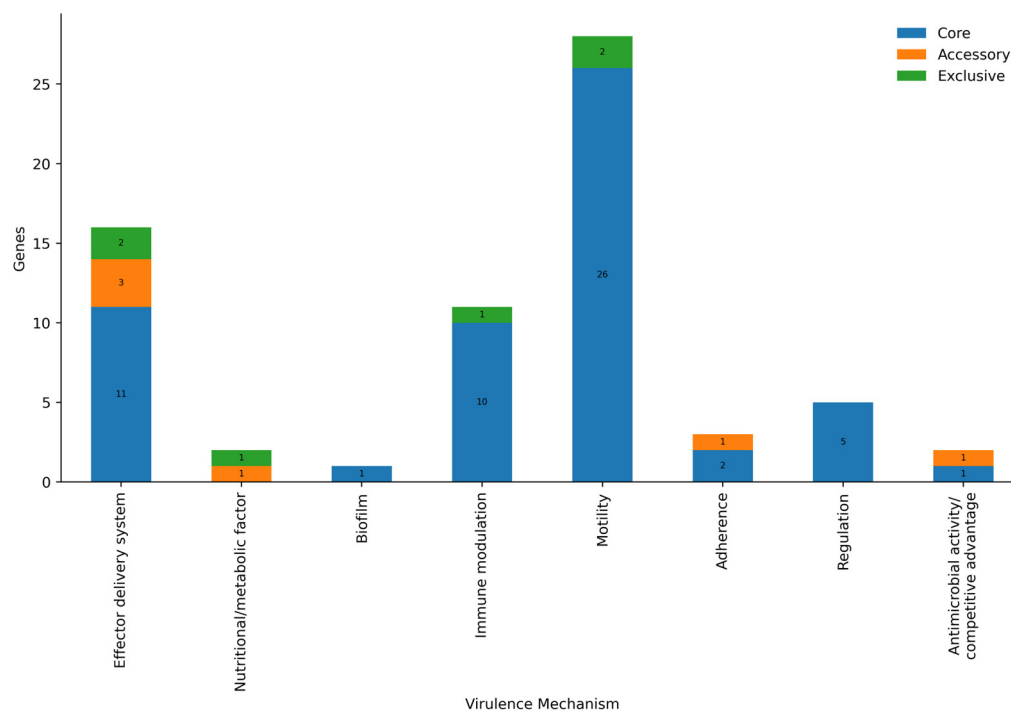


Figure 2. Bar chart showing the pan-virulome and its associated mechanisms. The *x*-axis represents the different mechanisms, while the *y*-axis represents the number of genes. The bars are color coded to distinguish among core, accessory, and exclusive gene categories.

The functions of the identified genes were analyzed using a pan-virulome approach, which revealed that they predominantly encode motility, effector delivery systems, and immune modulation genes. These functions, along with the nutritional/metabolic factor, pre-sense accessory genes. The nutritional/metabolic factor is the only function that is not present in the main genome. The clustermap showing the presence and absence of the genes between the two strains studied and the rest of *D. dadantii* is shown in Figure 3.

The *vgrG2* and *hcp1* genes, which are accessory genes in the pangenomic analysis, were identified. The other accessory genes are not present in the two strains, with the *atsS* and *tufA* virulence genes being present in most of the strains. In the core genome, the product = “VirK/YbjX family protein” was manually found in both strains. The complete list of virulence genes and their respective mechanisms and products are shown in Table S7.

3.3.2. Resistome: Heavy Metal and Biocide Genes

A total of 54 genes were found in the BacMet database. The resistome profiles of the isolates showed the presence of all the core genes. Notably, the analysis also revealed the presence of the exclusive genes, the *arsR* and *sdeB*, as shown in Figure 4 (the full list of genes, their products, and functions can be found in Table S8).

The heavy metals and biocides presented in Figure 5 facilitate the visualization of the amount of resistance genes and their respective compounds in a pan-resistome point of view.

The genes identified provide complete resistance to 15 different heavy metals. Of all metals analyzed, only lead does not have a core gene related to its resistance. Arsenic, cobalt, zinc, iron, and magnesium are the compounds with the most coverage genes present in the analysis (over 5). The unique genes found cover zinc, tellurium, cadmium, lead, cobalt, and nickel.

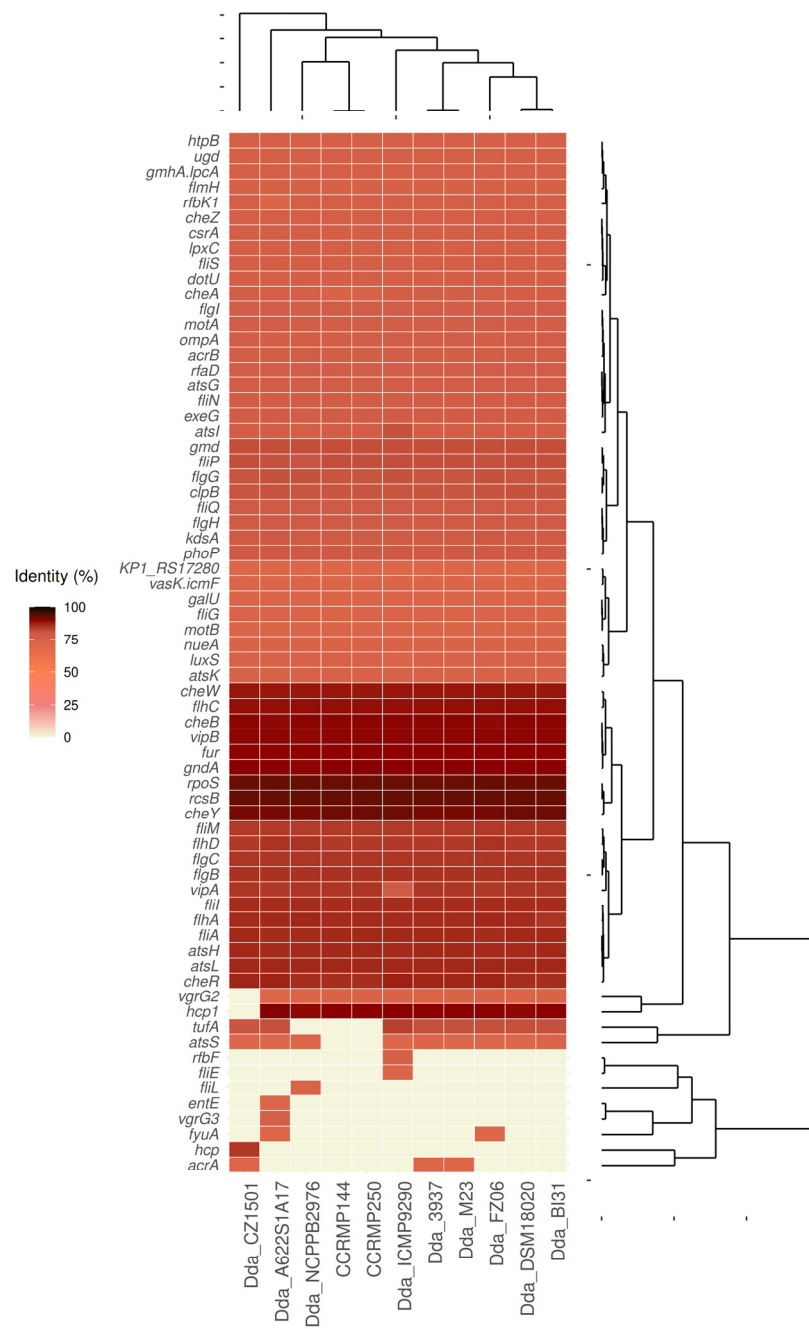


Figure 3. Clustermap indicating the presence of virulence genes in *D. dadantii* compared to the Virulence Factor Database (VFDB) database. The x-axis represents the genes found, while the y-axis represents the *D. dadantii* strains. The color gradient serves to highlight the identity level.

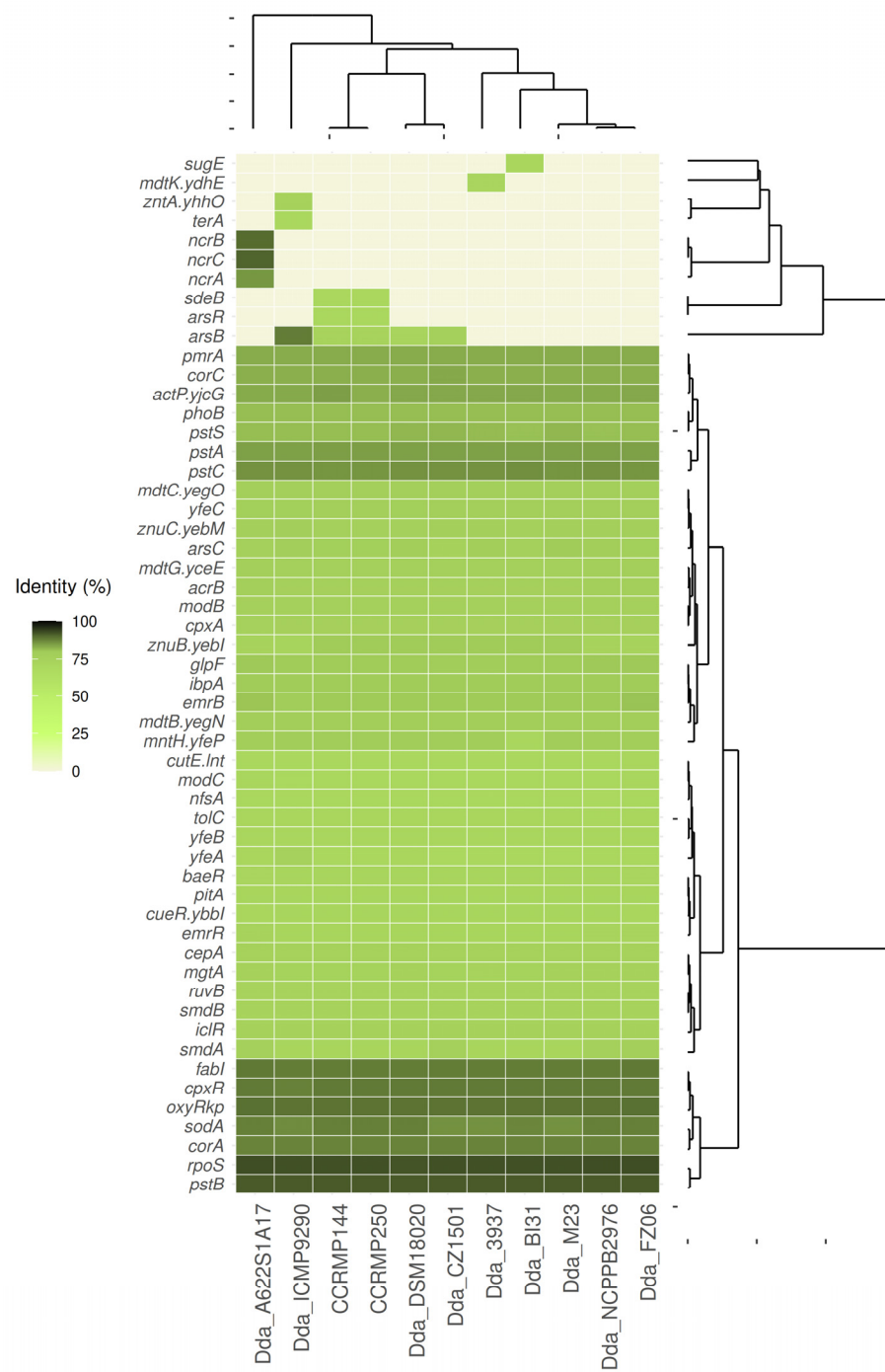


Figure 4. Clustermap indicating the heavy metal and biocide resistance genes between *D. dadantii* against BacMet database. The *x*-axis represents the heavy metal and biocide resistance genes, while the *y*-axis represents the *D. dadantii* strains. The color gradient serves to highlight the identity level.

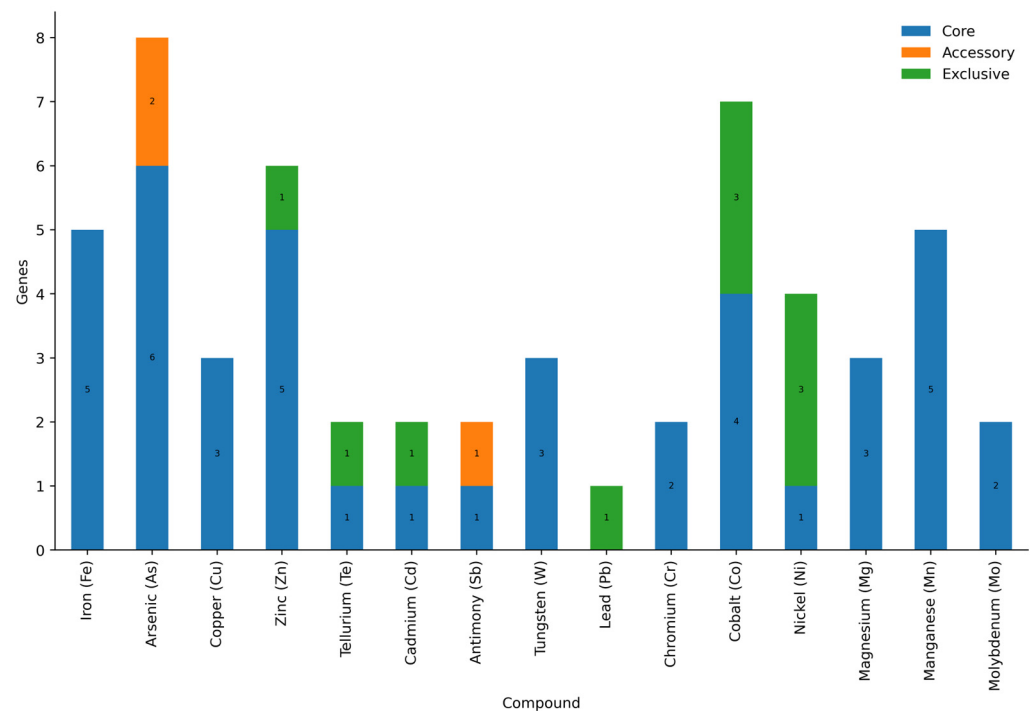


Figure 5. Bar chart showing heavy metal compounds from a pan-resistome perspective. The x-axis represents the different heavy metals, while the y-axis represents the number of genes found within the genus. The bar colors blue, orange, and green represent core, accessory, and exclusive, respectively.

3.3.3. Resistome: Antibiotic Resistance Genes

The search for antibiotic resistance genes revealed the presence of 23 genes in the CARD database (Figure 6). Notably, most of the resistome is comprised 16 core genes involved in antibiotic efflux mechanisms (Figure S3). In addition to the presence of all the core genes, the analysis identified the presence of the exclusive gene *oqx8* in both isolates. The full list of antibiotic resistance genes, together with their corresponding resistance mechanisms and drug classes, is given in Table S9.

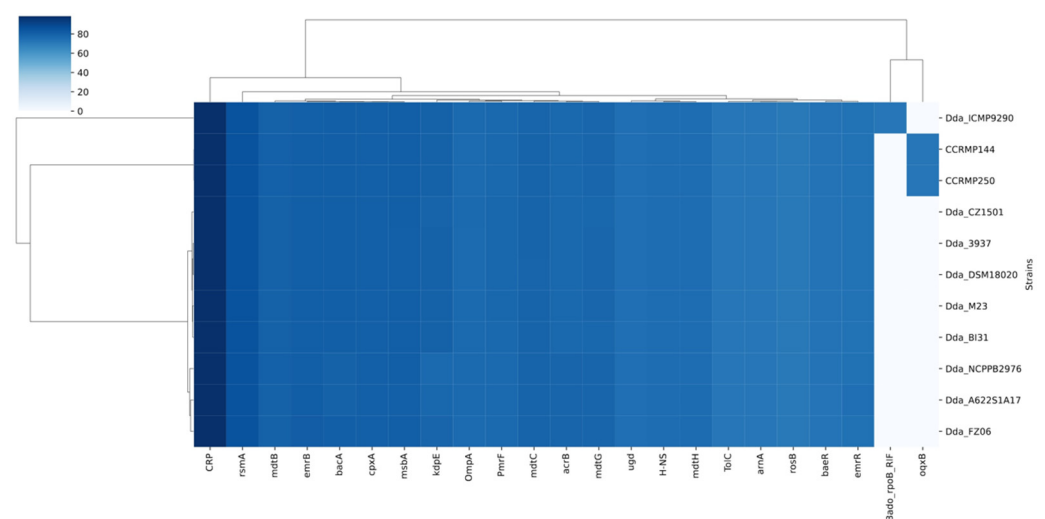


Figure 6. Clustermap illustrating the presence of antibiotic resistance genes in *D. dadantii* compared to the CARD database. The x-axis represents antibiotic resistance genes, while the y-axis represents the *D. dadantii* strains. The color gradient serves to highlight the identity level.

Figure 7 shows a wide range of different antibiotic classes, 19 in total. Most of the antibiotics are covered by core genes. Only the antibiotic nitrofuran had only one accessory gene. The classes of antibiotic genes that stand out in terms of the number of resistance genes are fluoroquinolones, peptides, aminocoumarin, aminoglycoside, penam and tetracycline. The fluoroquinolone, glycylicline, tetracycline, diaminopyrimidine, and nitrofuran classes have one accessory gene each.

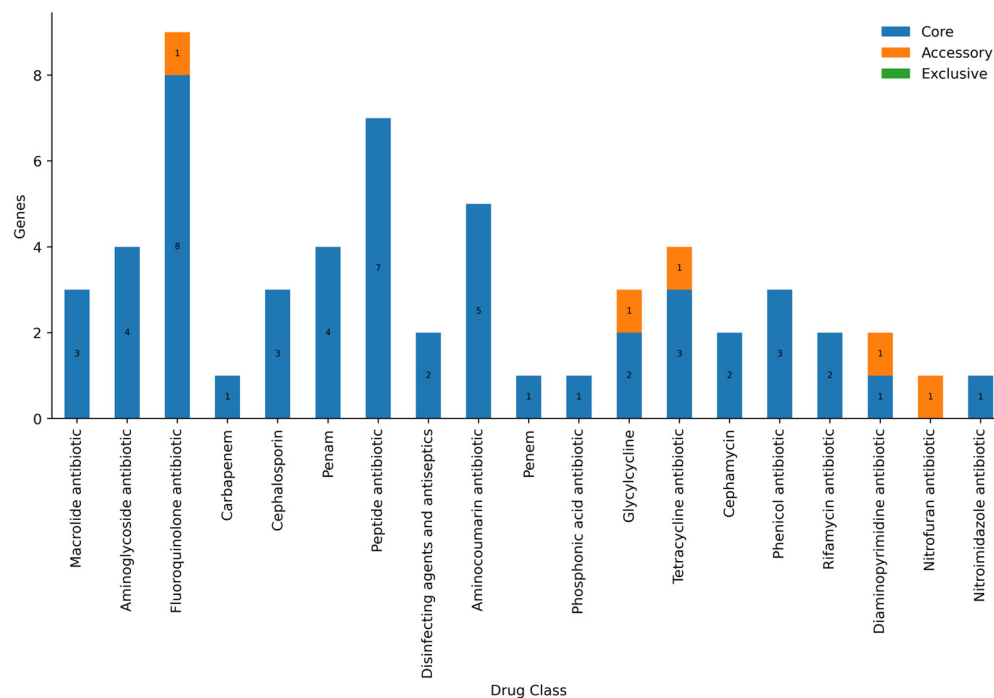


Figure 7. Bar chart showing a pan-resistome perspective of the drug classes. The x-axis represents the different drug classes, while the y-axis represents the number of genes found within the genus. The bar colors blue, orange, and green represent core, accessory, and exclusive, respectively.

4. Discussion

4.1. Evolutionary and Taxonomic Aspects of *Dickeya* spp.

The TCS results demonstrate a high degree of correlation (≥ 0.99) between the isolates and all other related species, with a particularly strong correlation observed with *D. dadantii* (Tables S1 and S2). This indicates a significant degree of similarity in their oligonucleotide composition. This observation suggests a close evolutionary relationship or that the genomes in question may belong to the same species.

The ANI results (Table 1) indicate that both isolates exhibited ANI values of $\geq 95\%$ with all other *D. dadantii* strains. Moreover, the phylogenomic analysis produced a tree with distinct clusters that closely align with TCS and ANI results, as well as with findings from other studies on *Dickeya* species [34–36]. The clear clustering of CCRMP144 and CCRMP250 into well-defined branches provides strong support for their classification within the *D. dadantii* species.

However, several *D. zea*, *D. oryzae*, and *D. parazeae* strains exhibited unexpected placements, indicating distinctive evolutionary pathways. These results highlighted a controversial issue of nomenclature within the *D. zea* complex. This problem has been highlighted by the investigation carried out by Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and Van Gijsegem, F., 2021 [37]. These findings suggest that the taxonomy of this complex remains unresolved, as evidenced by the high prevalence of misclassifications. In particular, the strain *D. zea* Dze_A586-S18-A17 forms a monophyletic clade with *D. parazeae* strains Dpa_Ech586 and Dpa_S31 (Figure 1 and Figure S2), with ANI values of 98.71% and 98.74%, respectively, while still showing ANI levels of $>95\%$ with most *D. zea* strains (Dze_A661-S21-A17,

Dze_BRIP64263, Dze_CE1, Dze_JZL7, Dze_MK19, Dze_MS_2014, Dze_MS_2018, Dze_MS1, MS2, Dze_NCPPB2538, Dze_NCPPB3532, and Dze_PL65) as presented in Table S6. Similarly, all the *D. oryzae* strains form a separated clade with the *D. zea* strains Dze_ZJU1202, Dze_EC1, Dze_DZ2Q, Dze_WH1, Dze_EC2, Dze_A5272, Dze_NCPPB3531, and Dze_A5410 as shown in Figures 1 and S2. These results indicate that these species may not be accurately classified, highlighting the need for a more robust taxonomic reassessment.

4.2. Virulome and Resistome: Navigating Pathogenic Landscapes

4.2.1. *Dickeya dadantii* Virulome

The virulome analysis of *Dickeya dadantii* reveals a wide range set of genes that contribute to its pathogenicity, highlighting the complex interplay of various virulence factors. For instance, the core virulome includes a suite of flagellar biosynthesis and chemotaxis genes (e.g., *fliA*, *fliG*, *flhA*, and *cheA*) (Figure 3 and Table S7), which are crucial for the assembly and function of the flagellum in many bacteria [38–41], including *Dickeya dadantii*, which was also found to be essential for the manifestation of various bacterial phenotypes, including biofilm formation in culture, bacterial adherence to plant tissue, and even the expression of pectate lyase activity [42]. The presence of these genes (Figure 2) corroborates with the hypothesis that active movement is crucial for the successful establishment of infection as previously described [43].

The prevalence of Type VI secretion system (T6SS) components, such as *vipA*, *vipB*, and *vgrG2*, further highlights the role of this complex in effector delivery. The T6SSs have the capacity to inject proteins into both eukaryotic cells and Gram-negative bacteria [44], which may indicate that the role of T6SS in *D. dadantii* extends beyond interbacterial interactions. Indeed, studies have indicated that they may also play a role in host–bacteria interactions in other phytopathogens [45,46].

Furthermore, both isolates were found to be missing two virulence genes (*atsS* and *tufA*) that are commonly present in the majority of the strains (Figure 3). The *atsS* protein functions as a component of the Type VI secretion system, which in *Pseudomonas aeruginosa* facilitates the delivery of effector molecules between bacterial cells [47]. The *tufA* product is the elongation factor thermal unstable Tu (EF-Tu), which is one of the most frequently occurring proteins found in bacteria. Various functions have been reported in the literature, including significant virulence factors such as adhesion to extracellular matrix components of the host [48]. It is important to note that antimicrobial resistance and virulence can have a negative or positive relationship and are not two independent characteristics; for example, in uropathogenic strains of *E. coli*, the acquisition of antibiotic resistance can induce the loss of virulence factors and biofilm formation [49]. The absence of these genes could also be explained by the fact that bacteria adjust their gene expression to optimize survival and growth in certain environments, resulting in variable or conditional gene expression, but further research is needed to establish the impact of the absence of these genes on virulence, given the detection of these isolates causing symptoms [50].

It is noteworthy that pectinases play a crucial role in the virulence of *D. dadantii* and are secreted through a Type-II secretion system [51]. Several genes are involved in the process of pectin degradation. These genes could not be found by the pan analyses as they are not present in the VFDB. However, the annotated genomes of the isolates identified the presence of pectin-degradation-related genes. Of the eight endo-pectate lyase genes identified in *D. dadantii*, only four were found in both isolates: *pelA*, *pelC*, *pelE*, and *pelL*. Additionally, two genes encoding exo-pectate lyases (*pelX* and *pelW*) were identified, which cleave pectin using a β -elimination mechanism that relies on calcium as a divalent cation cofactor 4. Furthermore, the presence of genes (*pemA* and *pemB*) whose products are pectin methylesterases (PME) was identified. These enzymes modify pectin enzymes by hydrolyzing the glycosidic bonds of pectic substances [52]. The presence of genes encoding pectin-degrading proteins was expected as they are required for the successful pathogenesis of soft rot bacteria [7,53].

Overall, the presented virulome analysis provides valuable insights into the pathogenic strategies of *D. dadantii*, emphasizing the crucial roles of motility, secretion systems, and regulatory networks in its virulence. The identification of both core, accessory, and exclusive virulence genes also suggests potential targets for future studies aimed at developing targeted control strategies against this pathogen.

4.2.2. *Dickeya dadantii*: Heavy Metal, Biocide, and Antibiotics Resistance Profile

The core genes, which are present across all bacterial isolates, are of fundamental importance with regard to survival and adaptation. Among these, genes involved in metal transport and homeostasis, such as the *corA* gene, play a pivotal role in regulating the uptake and balance of essential metals, including magnesium, nickel, and cobalt. Similarly, they are also involved in the virulence of other soft rot bacteria [54]. It is plausible that these genes are also involved in the virulence of *D. dadantii*. Additionally, the core genes encoding multidrug resistance efflux pumps, such as *acrB* and *mdtB* (Table S8), illustrate the bacteria's broad-spectrum defense mechanisms. These efflux systems are capable of expelling a diverse range of toxic compounds, including heavy metals such as zinc, copper, tungstate, and antibiotics [55].

Moreover, the heavy metal and biocide resistance profile indicated the presence of a few genes that were exclusive to the isolates, the *arsR* and *sdeB* (Figure 4). The *arsR* gene is linked to bacterial resistance to arsenic and is commonly present in human pathogenic bacteria. Arsenic is a notable global environmental pollutant, which has various sources such as household and industrial discharges, as well as natural occurrences in both aquatic and terrestrial ecosystems. In addition to its bioaccumulate and carcinogenic properties, its environmental impact is also intensified by its widespread use in pesticides, semiconductors, medicinal applications, and pigments [56]. In *Pseudomonas*, this gene encodes a repressor that controls the expression of the *ars* operon [57]. Notably, the gene *asrB* gene was also identified in strains Dda_DSM18020, Dda_CZ1501, and Dda_ICMP9290 (Figure 4), being the heavy metal with the highest number of related genes as shown in Figure 5. The presence of an additional gene associated with arsenic resistance in both isolates may be attributed to the soil type from which they were extracted, which may have a higher arsenic concentration. The second exclusive gene identified in the isolate's repertoire was *sdeB*, which is related to resistance to a broad range of antimicrobial agents and disinfectants as shown in Table S8. The same gene in *Serratia marcescens* functions as a multidrug efflux protein within the *sdeAB-tolC* efflux system, conferring resistance to antibiotic substances such as fluoroquinolones [58,59]. While the link between the resistome and the pathogenesis process of *D. dadantii* may not be completely elucidated, in some cases efflux pumps may also have a role in competition and host specificity. For example, the isolates' exclusive gene *sdeB* (Figure 4) participates in the extrusion of the antimicrobial plant chemical berberine [60]. In this context, the significant number of core genes linked to antibiotic efflux (Figure S3) could potentially confer resistance to defensive chemicals produced by plants.

Furthermore, the findings from the CARD database indicate that resistance genes are linked to various major antibiotic classes, including macrolides, aminoglycosides, fluoroquinolones, and tetracyclines, and are predominantly situated within the core genome (Figure 7). The presence of these genes in both core and accessory categories suggests that while the primary mechanisms of resistance are well conserved, there is also some variability that could be associated with the adaptation to specific environmental pressures or hosts [61], which is evidenced by the presence of the *Bado_rpoB_RIF* and *oqxB* genes in their resistome (Figure 6). While further studies are necessary to confirm whether the presence of both genes can confer resistance to the associated classes of antibiotics, detergents, and disinfectants (Table S9), in some cases like the *oqxB* gene, only its overexpression is already enough to provide resistance [62]. Interestingly, some antibiotic classes, such as nitrofurans, are exclusively represented by the accessory gene, *oqxB*, which is present only in the CCRMP144 and CCRMP250 strains, indicating a more sporadic distribution that may reflect more recent or localized acquisitions of resistance. The sporadic presence of the

oqxB gene in the isolates may be attributed to horizontal gene transfer events that have not yet become fixed within the bacterial populations. However, further research is necessary to verify the specific mechanisms by which these isolates acquired the *oqxB* gene and to investigate their ecological implications within *D. dadantii*.

5. Conclusions

This study represents a pioneering effort in the investigation of *D. dadantii* isolates from Brazil where research on this pathogen has been limited. This study is one of the first to use an in silico methodology for the taxonomic classification and characterization of virulence and resistance-associated genes in the Brazilian context. Our study has successfully taxonomically classified the isolates, characterized their phylogenetic relationships as well, and delved into their virulome and resistome profiles. The virulence and resistance factors were mapped, providing an understanding of the pathogenic potential of these isolates in comparison with all other described *D. dadantii* strains. The identification and characterization of specific virulence and resistance genes can facilitate targeted approaches and offer promising directions for the development of soft rot-resistant crops or the development of innovative control strategies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/taxonomy4040036/s1>, Figure S1: Average Nucleotide Identity of the 186 *Dickeya* genomes; Figure S2: Phylogenomic tree with all 186 *Dickeya* genomes; Figure S3: Pan-resistome of antibiotic resistance mechanisms; Table S1: reference of the 199 *Dickeya* genomes; Table S2: Quast parameters for assembly quality control of studied strains; Table S3: Strains removed from dataset; Table S4: Origin and reference for strains used in this study; Table S5: Tetra correlation search and Z-score for the CCRMP144; Table S6: Tetra correlation search and Z-score for the CCRMP250; Table S7: ANI percentage identities; Table S8: *Dickeya dadantii* virulence genes; Table S9: *Dickeya dadantii* biocide and heavy metals resistance genes; Table S10: *Dickeya dadantii* antibiotic resistance genes.

Author Contributions: Conceptualization, A.M.B.-I. and F.F.A.; methodology, A.M.B.-I. and F.F.A.; formal analysis M.S.P., D.L.N.R., P.A.S. and J.C.A.; resources, A.M.B.-I., B.B., V.A. and F.F.A.; data curation, M.S.P., D.L.N.R., J.C.A., D.V.D.C. and P.A.S.; writing—original draft preparation, M.S.P., D.V.D.C. and P.A.S.; writing—review and editing, M.S.P., D.L.N.R., J.C.A., D.V.D.C., P.A.S., M.A.S.G., E.B.d.S. and F.F.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by UFMG/REITORIA/PRPQ/FUNDO FUNDEP 01/2022 (No. 30201*18) and prize awarded by L'ORÉAL-UNESCO-ABC Para Mulheres na Ciência 2023—Life Sciences category.

Data Availability Statement: All data and materials used are available in this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Samson, R.; Legendre, J.B.; Christen, R.; Saux, M.F.-L.; 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 zaeae* Sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1415–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. van der Wolf, J.M.; Acuña, I.; De Boer, S.H.; Brurberg, M.B.; Cahill, G.; Charkowski, A.O.; Coutinho, T.; Davey, T.; Dees, M.W.; Degefu, Y.; et al. Diseases Caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* Species around the World. In *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*; Van Gijsegem, F., van der Wolf, J.M., Toth, I.K., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2021; pp. 215–261. ISBN 978-3-030-61458-4.
3. Charkowski, A.O. The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2018**, *56*, 269–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Brady, C.L.; Cleenwerck, I.; Denman, S.; Venter, S.N.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Coutinho, T.A.; De Vos, P. Proposal to Reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a New Genus, *Lonsdalea* Gen. Nov., as *Lonsdalea Quercina* Comb. Nov., Descriptions of *Lonsdalea quercina* Subsp. *quercina* Comb. Nov., *Lonsdalea quercina* Subsp. *Iberica* Subsp. Nov. and *Lonsdalea quercina* Subsp. *Britannica* Subsp. Nov., Emendation of the Description of the Genus *Brenneria*, Reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* Subsp. *Dieffenbachiae* Comb. Nov., and Emendation of the Description of *Dickeya dadantii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2012**, *62*, 1592–1602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; des-Combes, C.J.; 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2021**, *71*, 5037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sayers, E.W.; Bolton, E.E.; Brister, J.R.; Canese, K.; Chan, J.; Comeau, D.C.; Connor, R.; Funk, K.; Kelly, C.; Kim, S.; et al. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D20–D26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Reverchon, S.; Muskhelishvili, G.; Nasser, W. Virulence Program of a Bacterial Plant Pathogen: The *Dickeya* Model. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; Volume 142, pp. 51–92. ISBN 978-0-12-809385-6.
8. Curland, R.D.; Mainello, A.; Perry, K.L.; Hao, J.; Charkowski, A.O.; Bull, C.T.; McNally, R.R.; Johnson, S.B.; Rosenzweig, N.; Secor, G.A.; et al. Species of *Dickeya* and *Pectobacterium* Isolated during an Outbreak of Blackleg and Soft Rot of Potato in Northeastern and North Central United States. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1733. [[CrossRef](#)]
9. Podridão Mole—Portal Embrapa. Available online: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cebola/producao/doencas/pos-colheita/bacterianas/podridao-mole> (accessed on 15 February 2023).
10. Biz, A.; Farias, F.C.; Motter, F.A.; de Paula, D.H.; Richard, P.; Krieger, N.; Mitchell, D.A. Pectinase Activity Determination: An Early Deceleration in the Release of Reducing Sugars Throws a Spanner in the Works! *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109529. [[CrossRef](#)]
11. Mansfield, J.; Genin, S.; Magori, S.; Citovsky, V.; Sriariyanum, M.; Ronald, P.; Dow, M.; Verdier, V.; Beer, S.V.; Machado, M.A.; et al. Top 10 Plant Pathogenic Bacteria in Molecular Plant Pathology: Top 10 Plant Pathogenic Bacteria. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 614–629. [[CrossRef](#)]
12. 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* **1981**, *6*, 550–551.
13. Saettler, A.W.; Schaad, N.W.; Roth, D.A. (Eds.) *Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material*; The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA, 1989; ISBN 978-0-89054-098-5.
14. Moraes, A.J.G.; Souza, E.B.; Mariano, R.L.R.; Silva, A.M.F.; Lima, N.B.; Peixoto, A.R.; Gama, M.A.S. First Report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* Subsp. *Brasiliensis* Causing Soft Rot of *Cucurbita pepo* in Brazil. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 379. [[CrossRef](#)]
15. Babraham Bioinformatics—FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 22 November 2022).
16. Schubert, M.; Lindgreen, S.; Orlando, L. AdapterRemoval v2: Rapid Adapter Trimming, Identification, and Read Merging. *BMC Res. Notes* **2016**, *9*, 88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Gorrie, C.L.; Holt, K.E. Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUAST: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Manni, M.; Berkeley, M.R.; Seppey, M.; Zdobnov, E.M. BUSCO: Assessing Genomic Data Quality and Beyond. *Curr. Protoc.* **2021**, *1*, e323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lobb, B.; Tremblay, B.J.-M.; Moreno-Hagelsieb, G.; Doxey, A.C. An Assessment of Genome Annotation Coverage across the Bacterial Tree of Life. *Microb. Genom.* **2020**, *6*, 341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [[CrossRef](#)]
22. Richter, M.; Rosselló-Móra, R.; Oliver Glöckner, F.; Peplies, J. JSpeciesWS: A Web Server for Prokaryotic Species Circumscription Based on Pairwise Genome Comparison. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 929–931. [[CrossRef](#)]
23. Richter, M.; Rosselló-Móra, R. Shifting the Genomic Gold Standard for the Prokaryotic Species Definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 19126–19131. [[CrossRef](#)]
24. Pritchard, L.; Glover, R.H.; Humphris, S.; Elphinstone, J.G.; Toth, I.K. Genomics and Taxonomy in Diagnostics for Food Security: Soft-Rotting Enterobacterial Plant Pathogens. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 12–24. [[CrossRef](#)]
25. Emms, D.M.; Kelly, S. OrthoFinder: Phylogenetic Orthology Inference for Comparative Genomics. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 238. [[CrossRef](#)]
26. Kelly, S.; Maini, P.K. DendroBLAST: Approximate Phylogenetic Trees in the Absence of Multiple Sequence Alignments. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL): An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 127–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. FigTree. Available online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed on 14 May 2024).
29. Rodrigues, D.L.N.; Ariute, J.C.; Rodrigues da Costa, F.M.; Benko-Iseppon, A.M.; Barh, D.; Azevedo, V.; Aburjaile, F. PanViTa: Pan Virulence and resistance Analysis. *Front. Bioinform.* **2023**, *3*, 1070406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

30. Alcock, B.P.; Huynh, W.; Chalil, R.; Smith, K.W.; Raphenya, A.R.; Wlodarski, M.A.; Edalatmand, A.; Petkau, A.; Syed, S.A.; Tsang, K.K.; et al. CARD 2023: Expanded Curation, Support for Machine Learning, and Resistome Prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D690–D699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Pal, C.; Bengtsson-Palme, J.; Rensing, C.; Kristiansson, E.; Larsson, D.G.J. BacMet: Antibacterial Biocide and Metal Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D737–D743. [[CrossRef](#)]
32. Chen, L.; Yang, J.; Yu, J.; Yao, Z.; Sun, L.; Shen, Y.; Jin, Q. VFDB: A Reference Database for Bacterial Virulence Factors. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D325–D328. [[CrossRef](#)]
33. Glasner, J.D.; Yang, C.-H.; Reverchon, S.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Condemine, G.; Bohin, J.-P.; Van Gijsegem, F.; Yang, S.; Franza, T.; Expert, D.; et al. Genome Sequence of the Plant-Pathogenic Bacterium *Dickeya dadantii* 3937. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 2076–2077. [[CrossRef](#)]
34. Pédrón, J.; Van Gijsegem, F. Diversity in the Bacterial Genus *Dickeya* Grouping Plant Pathogens and Waterways Isolates. *OBM Genet.* **2019**, *3*, 098. [[CrossRef](#)]
35. Zhang, Y.; Fan, Q.; Loria, R. A Re-Evaluation of the Taxonomy of Phytopathogenic Genera *Dickeya* and *Pectobacterium* Using Whole-Genome Sequencing Data. *Syst. Appl. Microbiol.* **2016**, *39*, 252–259. [[CrossRef](#)]
36. Marrero, G.; Schneider, K.L.; Jenkins, D.M.; Alvarez, A.M. Phylogeny and Classification of *Dickeya* Based on Multilocus Sequence Analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 3524–3539. [[CrossRef](#)]
37. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Van Gijsegem, F. Diversity within the *Dickeya zeae* complex, Identification of *Dickeya zeae* and *Dickeya oryzae* Members, Proposal of the Novel Species *Dickeya parazeae* Sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2021**, *71*, 5059. [[CrossRef](#)]
38. Altarriba, M.; Merino, S.; Gavín, R.; Canals, R.; Rabaan, A.; Shaw, J.G.; Tomás, J.M. A Polar Flagella Operon (Flg) of *Aeromonas hydrophila* Contains Genes Required for Lateral Flagella Expression. *Microb. Pathog.* **2003**, *34*, 249–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kim, Y.R.; Rhee, J.H. Flagellar Basal Body Flg Operon as a Virulence Determinant of *Vibrio vulnificus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 405–410. [[CrossRef](#)]
40. Armitage, J.P. Microbial Primer: The Bacterial Flagellum—How Bacteria Swim: This Article Is Part of the Microbial Primers Collection. *Microbiology* **2024**, *170*, 1406. [[CrossRef](#)]
41. Macnab, R.M.; Parkinson, J.S. Genetic Analysis of the Bacterial Flagellum. *Trends Genet.* **1991**, *7*, 196–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jahn, C.E.; Willis, D.K.; Charkowski, A.O. The Flagellar Sigma Factor FliA Is Required for *Dickeya dadantii* Virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2008**, *21*, 1431–1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Antúnez-Lamas, M.; Cabrera-Ordóñez, E.; López-Solanilla, E.; Raposo, R.; Trelles-Salazar, O.; Rodríguez-Moreno, A.; Rodríguez-Palenzuela, P. Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology* **2009**, *155*, 434–442. [[CrossRef](#)]
44. Cotter, P. Molecular Syringes Scratch the Surface. *Nature* **2011**, *475*, 301–303. [[CrossRef](#)]
45. Mosquito, S.; Bertani, I.; Licastro, D.; Compant, S.; Myers, M.P.; Hinarejos, E.; Levy, A.; Venturi, V. In Planta Colonization and Role of T6SS in Two Rice *Kosakonia* Endophytes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2020**, *33*, 349–363. [[CrossRef](#)]
46. Yin, R.; Cheng, J.; Lin, J. The Role of the Type VI Secretion System in the Stress Resistance of Plant-Associated Bacteria. *Stress Biol.* **2024**, *4*, 16. [[CrossRef](#)]
47. Hood, R.D.; Singh, P.; Hsu, F.; Güvener, T.; Carl, M.A.; Trinidad, R.R.S.; Silverman, J.M.; Ohlson, B.B.; Hicks, K.G.; Plemel, R.L.; et al. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host Microbe* **2010**, *7*, 25–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Harvey, K.L.; Jarocki, V.M.; Charles, I.G.; Djordjevic, S.P. The Diverse Functional Roles of Elongation Factor Tu (EF-Tu) in Microbial Pathogenesis. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Cepas, V.; Soto, S.M. Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* **2020**, *9*, 719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Reverchon, S.; Nasser, W. *Dickeya* Ecology, Environment Sensing and Regulation of Virulence Programme. *Environ. Microbiol. Rep.* **2013**, *5*, 622–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Condemine, G.; Shevchik, V.E. Bacterial Pectate Lyases, Structural and Functional Diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* **2014**, *6*, 427–440. [[CrossRef](#)]
52. Manmohit Kalia, P.K. Pectin Methylsterases: A Review. *J. Bioprocess Biotech.* **2015**, *5*, 227. [[CrossRef](#)]
53. Van Gijsegem, F.; Toth, I.K.; van der Wolf, J.M. Soft Rot Pectobacteriaceae: A Brief Overview. In *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*; Van Gijsegem, F., van der Wolf, J.M., Toth, I.K., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2021; pp. 1–11. ISBN 978-3-030-61458-4.
54. Kersey, C.M.; Agyemang, P.A.; Dumenyo, C.K. *CorA*, the Magnesium/Nickel/Cobalt Transporter, Affects Virulence and Extracellular Enzyme Production in the Soft Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum*. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 58–71. [[CrossRef](#)]
55. Thekkiniath, J.; Ravirala, R.; San Francisco, M. Multidrug Efflux Pumps in the Genus *Erwinia*: Physiology and Regulation of Efflux Pump Gene Expression. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; Volume 142, pp. 131–149. ISBN 978-0-12-809385-6.
56. Kaur, S.; Kamli, M.R.; Ali, A. Role of Arsenic and Its Resistance in Nature. *Can. J. Microbiol.* **2011**, *57*, 769–774. [[CrossRef](#)]
57. Aguilar-Barajas, E.; Ramírez-Díaz, M.I.; Riveros-Rosas, H.; Cervantes, C. Heavy Metal Resistance in Pseudomonads. In *Pseudomonas*; Ramos, J.L., Filloux, A., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2010; pp. 255–282. ISBN 978-90-481-3908-8.

58. Kumar, A.; Worobec, E.A. Cloning, Sequencing, and Characterization of the SdeAB Multidrug Efflux Pump of *Serratia Marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1495–1501. [[CrossRef](#)]
59. Begic, S.; Worobec, E.A. The Role of the *Serratia marcescens* SdeAB Multidrug Efflux Pump and TolC Homologue in Fluoroquinolone Resistance Studied via Gene-Knockout Mutagenesis. *Microbiology* **2008**, *154*, 454–461. [[CrossRef](#)]
60. Barabote, R.D.; Johnson, O.L.; Zetina, E.; San Francisco, S.K.; Fralick, J.A.; San Francisco, M.J.D. *Erwinia Chrysanthemi* tolC Is Involved in Resistance to Antimicrobial Plant Chemicals and Is Essential for Phytopathogenesis†. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 5772–5778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Tettelin, H.; Medini, D. (Eds.) *The Pangenome: Diversity, Dynamics and Evolution of Genomes*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; ISBN 978-3-030-38280-3.
62. Li, J.; Zhang, H.; Ning, J.; Sajid, A.; Cheng, G.; Yuan, Z.; Hao, H. The Nature and Epidemiology of OqxAB, a Multidrug Efflux Pump. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, *8*, 44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5. DISCUSSÃO GERAL

Nos últimos anos as análises de bioinformática têm sido amplamente utilizadas devido às suas vantagens em relação às técnicas tradicionais, que demandam tempo, mão de obra e custos elevados, o que pode inviabilizar sua aplicação. Com os avanços na tecnologia de sequenciamento e o surgimento de técnicas como o sequenciamento de genoma completo (WGS), juntamente com o desenvolvimento de métodos computacionais inovadores, as metodologias tradicionais, como a hibridização DNA-DNA (DDH), têm sido substituídas por métodos *in silico* que oferecem maior reprodutibilidade, velocidade e especificidade (GORIS et al., 2007). Análises *in silico* como a tetra correlação de nucleotídeos e ANI têm ganhado destaque no estabelecimento de relações taxonômicas entre bactérias, sendo eficazes tanto a nível de espécie (MARRERO et al., 2013) quanto em casos de classificação taxonômica controversas, como acontece com os gêneros *Dickeya* e *Pectobacterium* (ZHANG; FAN; LORIA, 2016).

Os resultados da tetra correlação de nucleotídeos e ANI obtidos neste estudo revelaram-se eficientes, com valores compatíveis com estudos anteriores envolvendo diferentes espécies do gênero *Dickeya*. A escolha da linhagem *Pectobacterium atrosepticum* 21A para o enraizamento da inferência taxogenômica utilizando ortólogos foi baseada em sua proximidade taxonômica com gênero *Dickeya* e em seu genoma de referência amplamente conhecido, sendo frequentemente utilizado em estudos de genômica comparativa do gênero *Dickeya* (ALIČ et al., 2018). Os resultados das análises de genes ortólogos corroboram com estudos anteriores sobre *D. solani* (KHAYI; CHAN; FAURE, 2022), mas sem a presença de isolados provenientes do Brasil e sem cobertura ao nível de gênero. Esses resultados reforçam as análises de ANI, evidenciando as relações filogenéticas entre os isolados analisados e outras linhagens do gênero.

A caracterização dos repertórios do viruloma e resistoma de *D. dadantii* é essencial para compreender os mecanismos envolvidos na patogênese dessa bactéria. Esse conhecimento pode servir de base para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e controle da podridão mole, uma vez que as medidas preventivas continuam sendo as mais eficazes (CZAJKOWSKI et al., 2011). Neste contexto, observou-se uma significativa abundância de genes associados à mobilidade, ressaltando a importância da mobilidade para a virulência de *D. dadantii* conforme demonstrado em estudos anteriores (ANTÚNEZ-LAMAS et al., 2009; JAHN; WILLIS; CHARKOWSKI, 2008). Do ponto de vista ecológico, o perfil do resistoma encontrado sugere

adaptações específicas que contribuíram para o sucesso adaptativo de *D. dadantii* na região estudada. A presença de genes relacionados à resistência ao arsênio, *arsB* e *arsA* (Figura 5), sugerem uma adaptação ao ambiente, enquanto a presença do gene *sdeB*, exclusivo das linhagens estudadas, faz parte da bomba de efluxo *sdeAB-tolC*, que em *Serratia marcescens* é responsável por codificar uma proteína efetora relacionado a resistência a beta-lactâmicos. Até o momento, este é o primeiro relato deste gene em *D. dadantii* o que sugere uma possível transferência horizontal oriunda de outra bactéria de solo (DEMANÈCHE et al., 2008).

Embora a podridão mole causada por *Dickeya* seja uma das fitopatologias mais relevantes, ainda não há relatos da utilização da engenharia genética para a criação de variáveis resistentes à podridão mole. Contudo, os perfis de resistoma e viruloma encontrados podem ser usados para o melhoramento genético de plantas, visando a produção de plantas com mecanismos de defesa específicos para os genes centrais que são essenciais para a virulência de *D. dadantii* ou até mesmo na identificação de genes de interesse que estimulam resposta imune a outros tipos de estresse. Estudos genômicos aprofundados, auxiliam na identificação e seleção de tais genes, exemplos semelhantes que ilustram a relevância da identificação desses genes podem ser encontrados na literatura, como o caso do gene da flagelina encontrado em *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, cuja a inserção da região conservada deste gene em plantas transgênicas, demonstrou ser promissora ao desencadear respostas imunológicas ao fungo *Magnaporthe grisea*, agente causador da brusone do arroz (TAKAKURA et al., 2008). Apesar do sucesso na manipulação genética para resistência a fungos, insetos e outros estresses, a criação de plantas resistentes a bactérias como *Dickeya* apresenta desafios maiores (GOSAL; WANI, 2018), o que pode dificultar o desenvolvimento de cultivares resistentes à podridão mole.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Ao empregar métodos computacionais avançados, como algoritmos de montagem e análise de dados genômicos, foi possível identificar os isolados a nível de espécie, além de revelar incoerências taxonômicas envolvendo linhagens do complexo *zea*. Além disso, as análises *in silico* conduzidas neste estudo desempenham um papel essencial na compreensão da interação entre *Dickeya dadantii* e seus hospedeiros.

O perfil do resistoma e viruloma revelou informações importantes sobre o ambiente em que o fitopatógeno foi encontrado, além de identificar genes de interesse associados à virulência, resistência a pesticidas e adaptação ambiental deste fitopatógeno. Por fim, este estudo destaca-se por trabalhar com isolados brasileiros, contribuindo para o conhecimento a nível molecular da espécie e fornecendo novos *insights* sobre a ecologia da espécie em nível nacional e global.

7. PERSPECTIVAS

- Identificar e caracterizar o viruloma e o resistoma das outras espécies de *Dickeya* visando comparar os o panviruloma e panresistoma de todo o gênero.
- Encontrar possíveis alvos para criação de kits diagnósticos rápidos e de baixo custo para serem utilizados no campo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOLU, M. et al. 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, 1 dez. 2016.

Agro do Brasil no Mundo. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/campanhas/retrospectiva-2021/agro-do-brasil-no-mundo/agro-do-brasil-no-mundo>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

ALIČ, Š. et al. Diversity within the novel *Dickeya fangzhongdai* sp., isolated from infected orchids, water and pears. **Plant Pathology**, v. 67, n. 7, p. 1612–1620, set. 2018.

ANTÚNEZ-LAMAS, M. et al. Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). **Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 434–442, 1 fev. 2009.

BALAMURUGAN, A. et al. Characterization of *Dickeya fangzhongdai* causing bacterial soft rot disease on *Dendrobium nobile* in India. **European Journal of Plant Pathology**, v. 158, n. 3, p. 773–780, nov. 2020.

BELL, B. G. et al. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 13, dez. 2014.

BIZ, A. et al. Pectinase Activity Determination: An Early Deceleration in the Release of Reducing Sugars Throws a Spanner in the Works! **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109529, 22 out. 2014.

BOLUK, G. et al. *Dickeya colocasiae* sp. nov. isolated from wetland taro, *Colocasia esculentum*. [s.l.] **Microbiology**, 15 jan. 2022. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.01.14.476417>>. Acesso em: 1 set. 2023.

BRADY, C. L. et al. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a new genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt_7, p. 1592–1602, 1 jul. 2012.

CARDOZA, Y. F.; DUARTE, V.; LOPES, C. A. First Report of Blackleg of Potato Caused by *Dickeya solani* in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 1, p. 243–243, jan. 2017.

CATING, R. A. et al. First Report of Bacterial Soft Rot on *Vanda* Orchids Caused by *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) in the United States. **Plant Disease**, v. 92, n. 6, p. 977–977, jun. 2008.

CHARKOWSKI, A. O. The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, n. 1, p. 269–288, 2018.

CHEN, B. et al. Bleeding canker of pears caused by *Dickeya fangzhongdai*: Symptoms, etiology and biology. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 19, n. 4, p. 889–897, abr. 2020.

CHENG, Y. et al. A Sfp-type phosphopantetheinyl transferase ZmsO is essential for zeamines production and the virulence of *Dickeya zea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, n. 4, p. 937–948, dez. 2016.

COSTELLOE, C. et al. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 340, n. may18 2, p. c2096–c2096, 2 jun. 2010.

COUDRON, P. E.; MOLAND, E. S.; THOMSON, K. S. Occurrence and Detection of AmpC Beta-Lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Isolates at a Veterans Medical Center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1791–1796, maio 2000.

CROSS, A. S. What is a virulence factor? **Critical Care**, v. 12, n. 6, p. 197, 2008.

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

CZAJKOWSKI, R. et al. Virulence of ‘*Dickeya solani*’ and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Pathology**, v. 62, n. 3, p. 597–610, jun. 2013.

CZAJKOWSKI, R.; GRABE, G. J.; VAN DER WOLF, J. M. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 2, p. 263–275, out. 2009.

DAS CHAGAS OLIVEIRA FREIRE, F.; LUIZ MOSCA, J. Patógenos associados a doenças de plantas ornamentais no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 15, n. 1, 7 maio 2009.

DEMANÈCHE, S. et al. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3957–3962, 11 mar. 2008.

DIALLO, S. et al. Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 2, p. 349–354, out. 2009.

DOBRINDT, U. et al. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 414–424, 1 maio 2004.

FUJIMOTO, T. et al. First report of potato blackleg caused by *Dickeya chrysanthemi* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 86, n. 5, p. 423–427, set. 2020.

- GAMA, M. A. S. DA et al. **Estado da arte em fitobacterioses tropicais**. [s.l.] EDUFRPE, 2016.
- GORIS, J. et al. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 81–91, 1 jan. 2007.
- GOSAL, S. S.; WANI, S. H. Plant Genetic Transformation and Transgenic Crops: Methods and Applications. Em: GOSAL, S. S.; WANI, S. H. (Eds.). **Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 2**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 1–23.
- GRENIER, A.-M. et al. The Phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) Is a Pathogen of the *Pea Aphid*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1956–1965, mar. 2006.
- GUAN, Y. et al. First report of corn stalk rot caused by *Dickeya zae* on sweet corn in Shanghai, China. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 2, p. 557–558, maio 2020.
- HELLBERG, J. E. E. U.; MATILLA, M. A.; SALMOND, G. P. C. The broad-spectrum antibiotic, zeamine, kills the nematode worm *Caenorhabditis elegans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 26 fev. 2015.
- HU, M. et al. *Dickeya zae* strains isolated from rice, banana and clivia rot plants show great virulence differentials. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 136, dez. 2018.
- HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. et al. *Dickeya poaceiphila* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from sugar cane (*Saccharum officinarum*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4508–4514, 1 ago. 2020.
- HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. et al. 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**, v. 71, n. 10, 7 out. 2021.
- HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; JACOT-DES-COMBES, C.; BRIOLAY, J. *Dickeya lacustris* sp. nov., a water-living pectinolytic bacterium isolated from lakes in France. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 721–726, 1 mar. 2019.
- HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; VAN GIJSEGEM, F. Diversity within the *Dickeya zae* complex, identification of *Dickeya zae* and *Dickeya oryzae* members, proposal of the novel species *Dickeya parazeae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 11, 2 nov. 2021.
- JAHN, C. E.; WILLIS, D. K.; CHARKOWSKI, A. O. The Flagellar Sigma Factor FliA Is Required for *Dickeya dadantii* Virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 21, n. 11, p. 1431–1442, nov. 2008.

- JECHALKE, S. et al. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 9, p. 536–545, set. 2014.
- KHAYI, S.; CHAN, K.-G.; FAURE, D. Patterns of Genomic Variations in the Plant Pathogen *Dickeya solani*. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2254, 14 nov. 2022.
- LIANG, Z. et al. A Substrate-Activated Efflux Pump, DesABC, Confers Zeamine Resistance to *Dickeya zeae*. **mBio**, v. 10, n. 3, p. e00713-19, 25 jun. 2019.
- LIU, Q. et al. Identification of *Dickeya Dadantii* as a Causal Agent of Banana Bacterial Sheath Rot in China. **Journal of Plant Pathology**, v. 98, n. 3, p. 503–510, 2016.
- MA, B. et al. Host Range and Molecular Phylogenies of the Soft Rot Enterobacterial Genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. **Phytopathology**®, v. 97, n. 9, p. 1150–1163, set. 2007.
- MA, X. et al. First Report of *Dickeya fangzhongdai* Causing Soft Rot of Onion in New York State. **Plant Disease**, v. 104, n. 4, p. 1251, abr. 2020.
- MAHDIYOUN, S. M. et al. Frequency of Aminoglycoside-Resistance Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Hospitalized Patients. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 8, 26 jul. 2016.
- MANSFIELD, J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: Top 10 plant pathogenic bacteria. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 6, p. 614–629, ago. 2012.
- MARRERO, G. et al. Phylogeny and classification of *Dickeya* based on multilocus sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_9, p. 3524–3539, 1 set. 2013.
- OGOSHI, C. et al. First report of *Dickeya dadantii* causing a new disease of apple trees in Brazil. **New Disease Reports**, v. 39, n. 1, p. 8–8, jan. 2019.
- OULGHAZI, S. et al. *Dickeya undicola* sp. nov., a novel species for pectinolytic isolates from surface waters in Europe and Asia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 2440–2444, 1 ago. 2019.
- PANDIN, C.; CAROFF, M.; CONDEMINE, G. Antimicrobial Peptide Resistance Genes in the Plant Pathogen *Dickeya dadantii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 21, p. 6423–6430, nov. 2016.
- PARKINSON, N. et al. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt_7, p. 2264–2266, 1 jul. 2014.
- PATEL, N. et al. First Report of *Dickeya dianthicola* Causing Blackleg and Soft Rot on Potato (*Solanum tuberosum*) in New Jersey, U.S.A. **Plant Disease**, v. 103, n. 1, p. 146–146, jan. 2019.

PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2928, 30 nov. 2018.

Podridão mole - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cebola/producao/doencas/pos-colheita/bacterianas/podridao-mole>>. Acesso em: 15 fev. 2023.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**, v. 39, n. 3, p. 162–176, jan. 2007.

RAHME, L. G. et al. Common Virulence Factors for Bacterial Pathogenicity in Plants and Animals. **Science**, v. 268, n. 5219, p. 1899–1902, 30 jun. 1995.

RANGASAMY, K. et al. Emergence of multi drug resistance among soil bacteria exposing to insecticides. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 153–165, abr. 2017.

RANGASAMY, K. et al. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 304–310, 1 jan. 2018.

RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J. et al. Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 347–359, jun. 2021.

SAMSON, R. et al. 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 zae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1415–1427, 1 jul. 2005.

SAYERS, E. W. et al. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D20–D26, 7 jan. 2022.

SHARMA, A. K. et al. Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 1–10, mar. 2017.

SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 1, p. 45–60, 1 mar. 2013.

SINGER, R. S. et al. Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 47–51, jan. 2003.

SŁAWIAK, M.; ŁOJKOWSKA, E.; VAN DER WOLF, J. M. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. **Plant Pathology**, v. 58, n. 4, p. 794–794, ago. 2009.

SORBONNE UNIVERSITÉ, INRA, INSTITUTE OF ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL SCIENCES-PARIS (IEES-PARIS), 75252 PARIS CEDEX, FRANCE et al. Diversity in the Bacterial Genus *Dickeya* Grouping Plant Pathogens and Waterways Isolates. **OBM Genetics**, v. 3, n. 4, p. 1–1, 25 jul. 2019.

TAKAKURA, Y. et al. Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 4, p. 525–529, jul. 2008.

TIAN, Y. et al. *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 2831–2835, 1 ago. 2016.

VAN DER WOLF, J. M. et al. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt_3, p. 768–774, 1 mar. 2014.

VAN DER WOLF, J. M. et al. Diseases Caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* Species Around the World. Em: VAN GIJSEGEM, F.; VAN DER WOLF, J. M.; TOTH, I. K. (Eds.). **Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 215–261.

VAN GIJSEGEM, F.; VAN DER WOLF, J. M.; TOTH, I. K. (EDS.). **Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species**. Cham: Springer International Publishing, 2021.

WANG, X. et al. *Dickeya oryzae* sp. nov., isolated from the roots of rice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4171–4178, 1 jul. 2020.

WILLIS, B. E.; BISHOP, W. M. Understanding Fate and Effects of Copper Pesticides in Aquatic Systems. **Journal of Geoscience and Environment Protection**, v. 04, n. 05, p. 37–42, 2016.

WINSLOW, C.-E. A. et al. THE FAMILIES AND GENERA OF THE BACTERIA FINAL REPORT OF THE COMMITTEE OF THE SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS ON CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF BACTERIAL TYPES. **Journal of Bacteriology**, v. 5, n. 3, p. 191–229, maio 1920.

WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. Fluoroquinolone antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 4, p. 378–424, out. 1989.

WRIGHT, D. et al. First Report of *Dickeya dianthicola* in Potatoes in Australia. **Plant Disease**, v. 102, n. 10, p. 2029–2029, out. 2018.

YOUNG, A. J. et al. Heart rot of Australian pineapples caused by *Dickeya zea*. **Australasian Plant Pathology**, v. 51, n. 5, p. 525–533, set. 2022.

ZHANG, Y.; FAN, Q.; LORIA, R. A re-evaluation of the taxonomy of phytopathogenic genera *Dickeya* and *Pectobacterium* using whole-genome sequencing data. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 252–259, jun. 2016.

ZHOU, J. et al. A Novel Multidomain Polyketide Synthase Is Essential for Zeamine Production and the Virulence of *Dickeya zea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 24, n. 10, p. 1156–1164, out. 2011.