



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

Caracterização epidemiológica da podridão em escama da cebola

Walkíria Alves da Silva

Recife-PE

2016

WALKÍRIA ALVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA PODRIDÃO EM ESCAMA DA
CEBOLA**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientadora: Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientador: Dr. Adriano Marcio Freire Silva

RECIFE-PE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586c Silva, Walkíria Alves da
Caracterização epidemiológica da podridão em escama da
cebola / Walkíria Alves da Silva. – 2016.
49 f. : il.

Orientador: Marco Aurélio Siqueira da Gama.

Coorientadora: Elineide Barbosa de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Recife, BR-PE, 2016.

Inclui referências.

1. Complexo *Burkholderia cepacia* 2. Temperatura
3. Umidade 4. Idade do bulbo 5. Concentração de inoculo
I. Gama, Marco Aurélio Siqueira da, orient. II. Souza, Elineide
Barbosa de, coorient. Título

CDD 632

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA PODRIDÃO EM ESCAMA DA CEBOLA

WALKÍRIA ALVES DA SILVA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 29/07/2016.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Sônia Maria Alves de Oliveira

Prof. Dr. Kátia Cilene da Silva Felix

RECIFE - PE

JULHO - 2016

A Deus, que me orientou e fortaleceu, sempre me ajudando a não perder o equilíbrio.

DEDICO

Aos meus pais e a minha querida avó Maria, por todo amor e apoio durante toda minha vida.

Ao meu noivo, por toda paciência, dedicação e amor, suportando minha ausência em diversos momentos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar todos os meus dias e por sua infinita bondade e misericórdia.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional, e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama, pelo sua orientação, valiosos ensinamentos, paciência, atenção e por confiar em minha capacidade no desenvolvimento deste trabalho.

A prof. Dr. Elineide Barbosa de Souza, pelo incentivo, orientação neste trabalho e ensinamentos no decorrer de parte da minha vida acadêmica, os quais servirão para minha vida profissional e pessoal.

A prof. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano, com muito orgulho em ter sido sua aluna, por ter feito parte do grupo do Laboratório de Fitobacteriologia e por suas contribuições imensuráveis.

Ao Prof. Dr. Sami Michereff, pelo auxílio na realização das análises estatísticas, além das contribuições e ensinamentos científicos.

Ao Dr. Adriano Marcio Freire Silva, pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

Aos meus pais Willams e Iracema, minha irmã Wadja e minha avó Maria, pelo incentivo e por sempre estarem dispostos a me orientar e proporcionar amor.

Ao meu noivo Thiago, por todo amor, apoio, paciência e ajuda na concretização deste sonho de forma direta e indireta.

A querida Greecy Mirian, por sua amizade, contribuição, disponibilidade, ajudas incondicionais, até mesmo nas madrugadas e finais de semana de avaliação.

A todos os amigos do Laboratório de Fitobacteriologia: Jéssica, Ana, Emanuel, Leandro Velez, Leandro Victor, Pedro, Alessandra, Willams, Claudeana e Nelson pela amizade, apoio e ajuda em todos os momentos. E em especial a Joelma Santana e Edilaine Alves, pela ajuda incondicional.

A Darcy Martins, pela amizade e ajuda para realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, pelo carinho, paciência e motivação em todos os momentos.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS | V |
| RESUMO GERAL | VIII |
| GENERAL ABSTRACT | IX |
| CAPÍTULO I | 10 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 11 |
| CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA PODRIDÃO EM ESCAMA DA CEBOLA | 11 |
| 1. A cultura da cebola | 11 |
| 2. Podridão em escama da cebola | 12 |
| 3. Características do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> | 14 |
| 4. Epidemiologia e controle | 17 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 18 |
| CAPÍTULO II | 27 |
| EPIDEMIOLOGIA DA PODRIDÃO EM ESCAMA DA CEBOLA | 28 |
| Resumo | 28 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| Isolados bacterianos | 30 |
| Identificação dos isolados | 30 |
| Temperatura ideal de crescimento in vitro dos isolados | 31 |
| Influência da concentração do inóculo sobre a podridão em escama | 32 |
| Efeito da temperatura sobre a podridão em escama | 32 |
| Influência da presença de câmara úmida sobre a podridão em escama | 33 |
| Influência da amplitude do período de molhamento sobre a podridão em escama | 33 |
| Efeito da idade do bulbo sobre a podridão em escama | 33 |
| Análise estatística | 33 |
| RESULTADOS | 34 |
| Identificação através da sequência parcial do gene <i>recA</i> | 34 |
| Temperatura ideal de crescimento in vitro | 34 |

| | |
|---|----|
| Influência da concentração do inóculo sobre a podridão em escama | 34 |
| Efeito da temperatura sobre a podridão em escama | 34 |
| Influência da presença de câmara úmida sobre a podridão em escama | 35 |
| Influência da amplitude do período de molhamento sobre a podridão em escama | 35 |
| Efeito da idade do bulbo na severidade da podridão em escama da cebola | 35 |
| DISCUSSÃO | 35 |
| AGRADECIMENTOS | 39 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 47 |

RESUMO GERAL

A cebola é a terceira hortaliça em importância econômica no mundo, tendo destaque no Brasil como uma das hortaliças economicamente mais importantes, tanto pelo volume produzido como pela renda gerada. Esta cultura pode ser acometida por várias doenças, destacando-se a podridão em escama causada por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*. Na tentativa de determinar as condições favoráveis ao desenvolvimento de epidemias, o conhecimento da interação patógeno-hospedeiro-ambiente é imprescindível. Assim sendo, a concentração de inóculo adequada, a faixa de temperatura, o período de exposição à umidificação e a idade em que a planta hospedeira se torna mais suscetível para o estabelecimento de altos níveis de doença devem ser definidos para cada associação patógeno-hospedeiro. Embora essas características epidemiológicas sejam fatores primordiais para infecção e posterior desenvolvimento da podridão em escama, não existem informações consistentes a respeito da influência desses parâmetros sobre o comportamento da doença. Portanto, o presente trabalho teve como objetivos selecionar e identificar seis isolados do complexo *B. cepacia* e determinar a temperatura *in vitro*, avaliar o efeito da concentração de inóculo, temperatura, presença e tempo de exposição à câmara úmida e idade dos bulbos na severidade da podridão em escama da cebola. Por meio de Inferência Bayesiana, os isolados CRMB31, CRMB109 e CRMB259 foram identificados como *B. cenocepacia*, enquanto os isolados CRMB76, CRMB199 e CRMB222 foram identificados como *B. arboris*. A temperatura ideal de crescimento *in vitro* para os isolados de *B. cenocepacia* foi de 30°C, enquanto para os isolados de *B. arboris* foi de 28°C. As condições que predisuseram a ocorrência de severidade da podridão em escama mais elevadas foram carga de inóculo de 10⁸ UFC/mL, em conjunto com um período de molhamento de 48 h, temperaturas entre 35 e 40°C e tecidos mais novos. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado para determinação dos fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento da podridão em escama da cebola. Além disso, as informações obtidas neste estudo serão úteis para o entendimento de epidemias da podridão em escama e auxiliarão a implementação de estratégias para o controle da doença.

Palavras-chave: Complexo *Burkholderia cepacia*, temperatura, umidade, idade do bulbo, concentração de inóculo.

GENERAL ABSTRACT

The onion is the third vegetable in economic importance on the world, with emphasis on Brazil as one of the most economically important vegetable, both by the volume and the income produced. This culture can be affected by various diseases, especially the scale rot, caused by bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex. In an attempt to determine the favorable conditions for the development of epidemics, the knowledge of host-pathogen-environment interaction is essential. Thus, the appropriate inoculum concentration, the temperature range, the period of humidification exposure and the age, which the plant host becomes more susceptible to the establishment of high levels of disease, should be identified for each host-pathogen association. Although these epidemiological characteristics are the key factors for infection and subsequent development of rot in scale, there is no consistent information about the influence of these parameters on the behavior of the disease. Therefore, this study aimed to select and identify six isolates of *B. cepacia* complex, and determine the *in vitro* temperature, evaluate the effect of the inoculum concentration, temperature, presence and exposure to moisture chamber and the age of the bulbs in the severity of scale rot onion. Through Bayesian inference, the isolates CRMB31, and CRMB109 CRMB259 were identified as *B. cenocepacia*, while the isolates CRMB76, and CRMB199 CRMB222 were identified as *B. arboris*. The optimum temperature for *in vitro* growth of the isolates *B. cenocepacia* was 30°C, while for the isolates of *B. arboris* was 28°C. The conditions that predispose the occurrence of rot severity scale at higher inoculum were load of 10⁸ CFU/mL, together on a wetness of 48 h, temperature between 35 and 40°C and more young tissues. To our knowledge, this is the first study to determine the environmental factors favorable to the development of rot in onion scale. In addition, the information obtained in this study will be useful for understanding the epidemics of the rot in scale and will assist in the implementation of strategies to control the disease.

Key words: *Burkholderia cepacia* complex, temperature, moisture, age of onion bulb, inoculum concentration.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA PODRIDÃO EM ESCAMA DA CEBOLA

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura da cebola

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma das hortaliças de maior importância econômica no mundo, assumindo o terceiro lugar neste ranking (QUARTIERO et al., 2014), sendo a China, a Índia, os Estados Unidos, a Turquia e o Iran os principais produtores mundiais em 2014 (FAO, 2016). No Brasil, destaca-se ao lado da batata (*Solanum tuberosum* L.) e do tomate (*Solanum lycopersicum* L.), como as hortaliças economicamente mais importantes, tanto pelo volume produzido como pela renda gerada (LEITE, 2014). Na safra de 2015, a produção brasileira foi de aproximadamente 1.422.117 toneladas de cebola, com uma produção estimada para 2016 de 1.423.082 toneladas (IBGE, 2016).

Devido à diversidade climática das diversas regiões do Brasil, a produção de cebola ocorre ao longo de todos os meses do ano, com maior ou menor intensidade, dependendo do estado produtor (TRANI et al., 2014). A região Nordeste tem a vantagem de ser a única região brasileira com condições de ofertar o produto durante todos os meses do ano devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da cultura, como temperatura e fotoperíodo elevados. Isso permite que os produtores programem suas safras para os meses em que ocorre menor oferta do produto no mercado interno pelas regiões Sul e Sudeste, e conseqüentemente, o produto atinja preços mais elevados devido à menor oferta por essas regiões (ARAÚJO; CORREIA, 2007).

No Nordeste brasileiro a cebola é predominantemente produzida no Vale do São Francisco, onde é cultivada durante todo o ano (COSTA et al., 2002). A produção no Vale se desenvolve nos municípios pernambucanos de Belém do São Francisco, Cabrobó, Itacuruba, Floresta, Lagoa Grande, Orocó, Parnamirim, Petrolândia, Petrolina, Salgueiro, Santa Maria da Boa Vista e Terra Nova e nos municípios baianos de Abaré, Casa Nova, Curaçá, Itaguaçu, Juazeiro e Sento Sé. Fora do Vale, a cebola é produzida no município baiano de Irecê (RESENDE; COSTA, 2007; OLIVEIRA et al., 2016).

O gênero *Allium* pertencente à família Alliaceae, classe Monocotyledonea, ordem Asparagales (BOITEUX; MELO, 2015). A cebola é uma planta originária das regiões que

compreendem o Afeganistão, Irã e partes do Sul da antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) (KUNZ et al., 2009). Não existem relatos da ocorrência de populações dessa hortaliça em condições naturais ou fora da esfera da domesticação humana, caracterizando-a como uma “clutigem”. No entanto, diferentemente da maioria das plantas cultivadas, o centro exato de origem de *A. cepa* ainda permanece obscuro (BOITEUX; MELO, 2015).

As fases de crescimento da cebola podem ser descritas em três etapas: I - vegetativa, que compreende da semente até a germinação; II - crescimento de plântulas, que compreende desde a emergência até o aparecimento da quinta folha verdadeira; e III - crescimento da planta, que consiste do surgimento da sétima folha verdadeira até a maturação dos bulbos (NIESING, 2010).

As cultivares disponíveis no Brasil visam atender as exigências dos consumidores brasileiros, que preferem bulbos de tamanho médio (50-90 mm de diâmetro), com formato globular, película externa de cor bronzeada, uniforme e escamas internas de cor branca (LEITE et al., 2009). A escolha da cultivar para o plantio deve ser realizada em função da região de cultivo, do tipo de bulbo exigido pelo mercado e da época de plantio (RESENDE; COSTA, 2007). No Nordeste, tradicionalmente recomenda-se o plantio das cultivares amarelas Valeouro IPA-11, Pêra IPA-4, Texas Grano 502 PRR, Granex 429, Alfa Tropical e Roxa Franciscana IPA-10 (CANDEIA; SILVA; MENEZES, 2008).

A cultura da cebola é susceptível a uma série de doenças decorrentes do ataque de fungos ou bactérias (WALKER; GOLDBERG; CRAMER, 2009). Algumas destas doenças podem causar grandes perdas, tornando-se fatores limitantes ao cultivo se medidas de controle adequadas não forem adotadas. Dentre essas doenças destaca-se a podridão em escamas, a qual é uma doença de ocorrência generalizada que pode causar perdas de até 50% durante a comercialização dos bulbos (WORDELL FILHO; BOFF, 2006).

2. Podridão em escama da cebola

A podridão de escamas, também conhecida como camisa d'água ou capa d'água, está associada a bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (Palleroni e Holmes) Yabuuchi et al., *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* (Severini) Yabuuchi et al. e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (WORDELL FILHO; BOFF, 2006; OLIVEIRA et al., 2016), sendo

possivelmente a doença mais comum e importante em bulbos de cebola (ZAID; BONASERA; BEER, 2012).

Em estudo recentemente realizado por Oliveira et al. (2016) foi demonstrado que a podridão em escamas no Vale do São Francisco está associada a bactérias do complexo *B. cepacia*, *B. gladioli* pv. *alliicola* e *P. aeruginosa*. Utilizando sequenciamento e análise filogenética do gene 16S rRNA, o autor verificou que dos 45 isolados estudados, 29 pertenciam ao complexo *B. cepacia*. No entanto, as espécies do complexo envolvidas não foram identificadas. Adicionalmente, o autor ainda verificou que os isolados pertencentes ao complexo *B. cepacia* e *B. gladioli* pv. *alliicola* apresentaram maior agressividade a bulbos de cebola quando comparados a isolados de *P. aeruginosa*.

Essas bactérias infectam os tecidos foliares mais velhos, atingindo a haste ou o colo da planta, progredindo até atingir os catafilos mais externos, podendo alcançar o interior do bulbo, culminando em seu apodrecimento (GAVA; TAVARES, 2007). A colonização bacteriana envolve a multiplicação de células nos espaços intercelulares, conjuntamente com a produção de enzimas pectinolíticas que degradam as substâncias pécnicas, constituintes da lamela média, e levam a degeneração do tecido ou parte do tecido colonizado (PARKE; GURIAN-SHEMAN, 2001).

Os sintomas da podridão em escamas caracterizam-se pelo apodrecimento dos catafilos mais externos, tornando sua aparência úmida e de coloração amarelada (JACCOUD FILHO et al., 1987). Esta coloração é decorrente de minúsculos agregados subepidérmicos, os quais são produzidos pelo bulbo em resposta à infecção bacteriana (WORDELL FILHO; MARTINS; STADNIK, 2007). Bulbos doentes liberam um forte odor avinagrado e, em estádios mais avançados da doença, escamas sadias podem se desprender durante o manuseio dos mesmos (MASSOLA JÚNIOR; JESUS JÚNIOR; KIMATI, 2005). Além disso, a doença pode ser acelerada pelo excesso de água e nitrogênio antes da colheita, grau de maturidade dos bulbos, fermentos, condições de umidade durante a colheita e temperaturas acima de 30° C (WALKER; GOLDBERG; CRAMER, 2009). Danos nos bulbos causados durante o tempo de cura também podem resultar em um aumento da incidência da doença em cebolas (WRIGHT; CLARK; HALE, 1993).

Na fase de pós-colheita, as bactérias do complexo *B. cepacia* associadas à doença podem iniciar a infecção das escamas e *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones)

Hauben et al., afetar o restante do bulbo penetrando a partir destas escamas e causando podridão mole (EMBRAPA, 2005). Essa última bactéria é de ocorrência bastante comum em muitos vegetais, durante o armazenamento ou transporte, o que torna o patógeno passível de causar perdas significantes em cebolas armazenadas (LEE et al., 2005). No entanto, a podridão mole pode ser facilmente diferenciada da podridão em escamas uma vez que os sintomas da primeira são observados exclusivamente na parte central dos bulbos (WORDELL FILHO; MARTINS; STADNIK, 2007).

3. Características do complexo *Burkholderia cepacia*

A podridão em escama foi descrita pela primeira vez em 1950, sendo o agente causal classificado como *Pseudomonas cepacia* (Palleroni e Holmes) (JACOBS et al., 2008). Posteriormente, em 1992, o gênero *Burkholderia* foi criado por Yabuuchi et al. com base em características fenológicas, composição de ácidos graxos, homologia DNA-DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA, para abrigar *P. cepacia* e mais seis espécies até então abrigadas no gênero *Pseudomonas* (MOREIRA; SILVA; ABRAHÃO, 2010). Em 1997, Vandamme et al. (1997) utilizou características fenotípicas e genotípicas para separar *B. cepacia* em genomovares (PARKE; GUIRIAN-SHERMAN, 2001).

Atualmente o complexo *B. cepacia* é formado por 20 espécies distintas (VICENZI et al., 2016), porém estreitamente relacionadas, chamadas de genomovares (MANO, 2015). Por sua vez, a designação do termo genomovar indica distinção genética suficiente para delinear as espécies, mas sem caracteres fenotípicos suficientes para reforçar esse delineamento (PARKE; GUIRIAN-SHERMAN, 2001). Adicionalmente, a utilização da análise de sequências multilocus (multilocus sequence analysis - MLSA), considerada como uma poderosa ferramenta taxonômica tanto para identificação como para tipagem de isolados, tem sido utilizada para diferenciação de bactérias pertencentes ao complexo *B. cepacia* (PEETERS et al., 2013).

Até o momento, as bactérias do complexo associadas à podridão em escama são *B. cepacia*, *B. cenocepacia* (Vandamme et al.), *B. ambifaria* (Coenye et al.), *B. multivorans* (Vandamme et al.) e *B. vietnamiensis* (Gillis et al.) (JACOBS et al. 2008; LEE; CHAN, 2007; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDEBERG, 2005; WORDELL FILHO e BOFF, 2006). No entanto, devido ao grande número de publicações informando a descoberta de novas espécies

pertencentes ao complexo (VANDAMME; DAWYNDT, 2011), existe uma grande probabilidade de novas espécies fitopatogênicas serem descobertas. Adicionalmente, embora a doença tenha sido assinalada na região semiárida do Nordeste brasileiro, ainda não se sabe ao certo quais espécies do complexo são responsáveis por causar a podridão em escamas da cebola nessa região (OLIVEIRA et al., 2016).

Bactérias do complexo *B. cepacia* apresentam-se em forma de bastonetes, são Gram negativas, aeróbicas, oxidase positiva, possuem células móveis, que medem de 1,6 a 3,2 µm por 8 a 10 µm, com flagelo monotríquico e pertencem ao filo Proteobacteria, classe das Betaproteobacterias, família Burkholderiaceae e ao gênero *Burkholderia* (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008). Possuem crescimento ótimo a 37°C, mas podem crescer até 42°C. São resistentes a altas concentrações de sais e diversos antibióticos (DEUS, 2007). Utilizam diversas fontes de carbono (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008). No entanto, alterações simples nessas fontes podem alterar a morfologia das colônias de espécies do complexo cultivadas em meio sólido (WORDELL FILHO; BOFF, 2006). A camada de lipopolissacarídeo das diferentes bactérias do complexo é ligeiramente diferente de outras bactérias Gram negativas, pois as primeiras apresentam maior nível de toxidez (LEITE, 2009). Adicionalmente, as espécies fitopatogênicas acumulam ácido poli-β-hidroxibutírico como material de reserva e não produzem pigmentos fluorescentes (KADO, 2010).

Todas as espécies do complexo *B. cepacia* possuem um grande genoma, variando de 6 e 9 Mb, uma característica genética responsável pela sua capacidade em causar doença em diferentes organismos e capacidade de sobreviver em diferentes ambientes (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008). Além disso, o genoma varia de dois a quatro cromossomos de diferentes tamanhos, contendo um grande número de sequências de inserção (MOREIRA; SILVA; ABRAHÃO, 2010). Essa quantidade de sequências de inserção pode favorecer a frequência de recombinação e mutações genéticas, o que pode influenciar a adaptação a diferentes ambientes (RAMETTE; LIPUMA; TIEDJE, 2005).

O complexo *B. cepacia* apresenta espécies que são distintas na natureza, ocupando uma grande variedade de nichos ecológicos (LOPES, 2012). Os reservatórios naturais dessas bactérias incluem água, solo e as plantas, constituindo um grupo de bactérias bastante versátil pela sua habilidade de se adaptar aos ambientes mais diversos (LEITE, 2009). No âmbito geral, essas espécies apresentam requerimentos nutricionais simples e grande versatilidade metabólica

(DEUS, 2007), o que lhes proporciona uma variedade de ambientes para sua proliferação (LUTZ et al., 2011).

Esse grupo de bactérias é composto por espécies que podem ser classificadas como patogênicas a humanos, animais e vegetais, além de espécies que possuem notória capacidade de degradar poluentes e fixar nitrogênio (MOREIRA; SILVA; ABRAHÃO, 2010). Existem ainda as espécies que podem atuar como agente de biocontrole (HOLMES; GOVAN; GOLDSTEIN, 1998). Apesar das propriedades úteis de alguns desses organismos, a aplicação comercial de produtos a base de isolados do complexo *B. cepacia* é duvidosa devido aos riscos que essas bactérias podem representar à saúde humana, pois algumas dessas espécies do complexo estão associadas à infecção hospitalar em pacientes imunocomprometidos e ao rápido declínio das funções pulmonares de pacientes com fibrose cística (RAMETTE; LIPUMA; TIEDJE, 2005).

Atualmente não é possível distinguir isolados patogênicos ao homem de isolados fitopatogênicos, ou mesmo os patogênicos dos não patogênicos ao homem. Uma exceção parece ser a patogenicidade à cebola, pois isolados clínicos são aparentemente incapazes de macerar tecido de cebola ou produzir enzimas pectinolíticas (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). Por outro lado, as bactérias desse complexo que se comportam como fitopatógenos são considerados como patógenos primários em cebola e oportunistas em tomate, feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.) e milho (*Zea mays* L.) (BRADBURY, 1986). Apresentam alta capacidade de síntese de enzimas pectinolíticas e produção de antibióticos capazes de suprimir outros micro-organismos, o que lhes confere vantagens competitivas enquanto fitopatógenos (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001).

Em relação ao conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade e virulência, as informações sobre o complexo ainda são limitadas (CARVALHO et al., 2007). Além disso, por ser um patógeno oportunista em humanos, a maior parte do conhecimento obtido sobre estas bactérias é proveniente da área médica (PEETERS, et al., 2013; RAMSAY, et al, 2013; SENIOR et al., 2014). Portanto, pesquisas na área agrícola ainda precisam evoluir.

Todas as espécies deste complexo possuem pelo menos um sistema clássico de quorum-sensing, o qual se caracteriza como um mecanismo útil para adaptação às alterações ambientais, regulando a expressão de vários fatores de virulência como a produção de toxinas, proteases, lipases e sideróforos (LEITÃO; SOUSA; FERREIRA, 2010). Além disso, mais de um tipo de sistema de secreção está presente nas espécies do complexo (KADO, 2010).

4. Epidemiologia e controle

As perdas devido à podridão em escama podem ocorrer durante o armazenamento, contudo a infecção geralmente ocorre no campo após a formação dos bulbos (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). Antes da bulbificação, a cebola apresenta-se resistente aos isolados do complexo *B. cepacia*, aparentemente pelo fato do ambiente apresentar-se desfavorável a multiplicação bacteriana até a iniciação desse evento, embora não se tenham estudos suficientes que comprovem esta hipótese (DAVIS, 1995).

No campo, células bacterianas presentes no solo ou na água de irrigação invadem o tecido do bulbo a partir das folhas infestadas (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). O inoculo tem sido associado com a água de irrigação contaminada e salpicos de água da chuva ou de irrigação por aspersão que podem levar células bacterianas que vivem na água ou no solo para o pescoço da planta. Além disso, a presença de água provoca o encharcamento no tecido hospedeiro (DAVIS, 1995).

A temperatura ideal para o desenvolvimento da podridão em escamas oscila entre 30 e 35°C em presença de água livre (DAVIS, 1995; WORDELL FILHO; BOFF, 2006). Normalmente, os bulbos são infectados através de ferimentos (DAVIS, 1995). A bactéria consegue penetrar na planta quando as folhas das cebolas são cortadas no momento da colheita ou através de outros ferimentos no pescoço quando a folhagem cai durante a maturação do bulbo. A infecção também pode ocorrer quando a água contaminada com células bacterianas invade as folhas mais jovens e fluem para dentro do pescoço, na axila da folha. A infecção avança para os bulbos através da folha infectada e catafilos correspondentes, mas não se move para catafilos adjacentes. Folhas jovens são muito mais susceptíveis do que as folhas mais velhas, que geralmente são assintomáticas (DAVIS, 1995).

Um dos fatores limitantes à redução de perdas no cultivo de cebola é a falta de um sistema eficiente de detecção precoce da presença de doenças (PRITHIVIRAJ et al., 2004). Nesse sentido, o controle integrado das podridões em bulbos de cebola deve ser realizado de forma preventiva (REIS; HENZ; LOPES, 2007). Por ser um patógeno que penetra por meio de ferimentos, deve-se ter o máximo cuidado nos tratamentos culturais durante o ciclo da cultura e no manuseio de bulbos durante a colheita e o armazenamento, evitando-se qualquer choque que possa comprometer a integridade das escamas ou ferir as folhas próximo ao pescoço (WORDELL FILHO; BOFF,

2006). Também é importante colher os bulbos somente no estágio de maturação correto e armazenar os bulbos em baixas temperaturas, com baixa umidade do ar e em locais aerados, assim como realizar a eliminação de plantas com sintomas no campo e descartar bulbos contaminados durante a colheita (REIS; HENZ; LOPES, 2007; ROMEIRO; OLIVEIRA; MELO, 1993). Como não se dispõe de variedades com resistência comprovada ao complexo *B. cepacia*, faz-se necessário um cuidadoso planejamento do cultivo (GAVA; TAVARES, 2007). Além disso, a capacidade de diferenciar isolados do complexo de forma individual tem sido crucial para compreender a sua epidemiologia (MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005).

Entre diversos fatores, as condições climáticas como temperatura e umidade podem propiciar condições favoráveis aos patógenos ou predispor as plantas à infecção (VIDA et al., 2004). Por exemplo, o tempo de exposição do vegetal a água, decorrente do orvalho, neblina, chuva ou irrigação é um importante fator epidemiológico de doenças de plantas, uma vez que desempenha um papel fundamental em alguns processos (PAULA et al., 2012), tal como o processo de infecção anteriormente descrito.

Na tentativa de determinar as condições favoráveis ao desenvolvimento de epidemias, o conhecimento da interação patógeno-hospedeiro-ambiente é imprescindível. Assim, a idade em que a planta hospedeira se torna mais suscetível, a faixa de temperatura e o período de exposição à umidificação, bem como a concentração de inóculo adequada para o estabelecimento de altos níveis de doença, devem ser definidos para cada associação patógeno-hospedeiro (SILVEIRA; MARIANO; MICHEREFF, 2004). No entanto, embora esses parâmetros epidemiológicos sejam fatores primordiais para infecção e posterior desenvolvimento da podridão em escama da cebola ainda não existe informações consistentes a respeito da influência desses parâmetros sobre o comportamento da doença. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar o comportamento epidemiológico de isolados do complexo *B. cepacia* associados à podridão em escamas da cebola.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. L. P.; CORREIA, R. C. **Cultivo da cebola no Nordeste: economia**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/custos.htm>>. Acesso em: 03 jul. 2016.

BOITEUX; L. S.; MELO, P. C. T. **Cultivo da cebola: taxonomia e origem**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2015. Disponível em:<http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/taxonomia_e_origem.htm>. Acesso em: 27 mai. 2016.

BRADBURY, J. F. Guide to plant pathogenic bacteria. Kew: CAB International, 1986. 332p.

CANDEIA, J. A.; SILVA, M. C. L.; MENEZES, J. T. **Cultura da cebola**. Recife: IPA, 2008. 1 p. (Boletim técnico, 25).

CARVALHO, A. P.; VENTURA, G. M.; PEREIRA, C. B.; LEÃO, R. S.; FOLESCO, T. W.; HIGA, L.; TEIXEIRA, L. M.; PLOTKOWSKI, M. C.; MERQUIOR, V. L.; ALBANO, M. R.; MARQUES, E. A. *Burkholderiacenocepacia*, *B. multivorans*, *B. ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Kobenhavn, v. 115, n. 4, p. 8-311, 2007.

COSTA, N. D.; QUEIROZ, M. A.; ARAÚJO, J. C.; SANTOS, C. A. F.; FARIA, C. M. B.; HAJI, F. N. P.; TAVARES, S. C. C. H. **A cultura da cebola**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 107 p. (Coleção Plantar, 45).

DAVIS, R. M. Soft Rot. In: SCHAWARTZ, H.; MOHAN, S. K. (Ed.). **Compendium of onion and garlic diseases**. 2. Ed. Minnesota: Saint Paul, 1995. p. 32-33.

DEUS, M. F. **Purificação parcial de proteínas antimicrobianas secretadas pela bactéria *Burkholderia cepacia***. 2007, 49 f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2007.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Agência de Informação Embrapa**. Pós-colheita, 2005. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cebola/arvore/CONT000gnnnbhvb02wx5ok0cdjv sckfte1h5.html>>. Acesso em: 25 jun. 2016.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Statistical yearbook world food and agriculture**. FAOSTAT.2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

GAVA, C. A. T.; TAVARES, S. C. C. H. **Cultivo da cebola no nordeste: doenças**.2007. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/doencas.htm>> Acesso em: 23 mai. 2016.

HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural Use of *Burkholderia cepacia*: Athreat to humam health? **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 2, p. 221-227, 1998.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da Produção Agrícola, 2015**. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201501.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

JACOBS, J. L.; FASI, A. C.; RAMETTE, A.; SMITH, J. J.; HAMMERSCHMIDT, R.; SUNDIN, G. W. Identification and Onion Pathogenicity of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates from the Onion Rhizosphere and Onion Field Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n.10, p. 3121-3129, 2008.

JACCOUD FILHO, D. S.; ROMEIRO, R.S.; KIMURA, O.; ZAMBOLIM, L.; SOUZA, R. M. Podridão bacteriana da escama – uma nova doença da cebola em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, p. 395-396, 1987.

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

KUNZ, V. L.; SIRTOLI, L. F.; FURLAN, L.; POLETTI, L.; PRIMO, M. A.; RODRIGUES, J. D. Produtividade de cebola sob diferentes fontes e modos de aplicação de adubos nitrogenados em cobertura. **Revista Biodiversidade**, Rondonópolis, v.8, n.1, p. 31-37, 2009.

LEE, C. J.; LEE, J. T.; KWON, J. H.; KIM, B. C.; PARK, W. Occurrence of bacterial soft rot of onion plants caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* in Korea. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 34, n. 3, p. 287-292, 2005.

LEE, Y. A.; CHAN, C. W. Molecular typing and presence of genetic markers among strains of banana finger-Tip rot pathogens, *Burkholderia cenocepacia*, in Taiwan. **Phytopathology**, Saint Paul, v.97, n. 2, p. 195-201, 2007.

LEITE, D. L. **Produção de Sementes de Cebola**. Pelotas: Embrapa Clima temperado, 2014. 9 p. (Circular técnica, 142).

LEITE, D. L.; OLIVEIRA, R. V.; SANTOS, C. A. F.; COSTA, N. D.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; MELO, P. E.; REIS, A.; UENO, B.; BAPTISTA, M. J. Melhoramento genético de cebola para as condições tropicais e subtropicais do Brasil. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, Tunja, v. 3, n. p. 18-27, 2009.

LEITE, F. C. **Variantes genômicas do complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística no hospital das Clínicas em Porto Alegre**. 2009, 65f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

LEITÃO, J. H.; SOUSA, A.; FERREIRA, A. S. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. **Applied Microbiology Biotechnology**, Wolverhampton, v. 87, n, 1, p.31-40, 2010.

LOPES, A. R. J. **Avaliação de mecanismo de escape imunológico do Complexo *Burkholderia cepacia***. 2012, 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética molecular e biomedicina) – Faculdade de ciências e tecnologia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

LUTZ, L.; PARIS, F.; VIEIRA, M. I.; MARQUES, E. A.; BARTH, A. L. Bacteriologia da fibrose cística. **Revista HCPA**, Porto Alegre, v. 31, n. 2, p. 168-184, 2011.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 104, n. 6, p. 1539-1551, 2008.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 3, n. 3, p. 144-156, 2005.

MANO, T. E. **Prospecção de genes de *Burkholderia ceminalis* TC3.4.2R3 com potencial para biocontrole**. 2015, 122 f. Tese (Doutorado em Interunidade em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MASSOLA JÚNIOR, N. S.; JESUS JÚNIOR, W. C.; KIMATI, H. Doenças do alho e da cebola (*Allium sativum* e *A. cepa*). In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. Doenças do alho e da cebola. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 53-63.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; ABRAHÃO, R. S. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Piauí, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

NIESING, P. C. **Manejo da palhada de milho na semeadura direta de cebola**. 2010, 76 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

- OLIVEIRA, W. J. **Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido brasileiro**. 2016, 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
- PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* Complex and implications for risk Assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 39, n. 1, p. 225-58, 2001.
- PAULA, V. A.; BERGAMASCHI, H.; PONTE, M. D.; CARDOSO, L. S.; BOSCO, L. C. Duração do período de molhamento foliar em pomares de macieira em céu aberto e sob tela antigranizo, em vacaria-RS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 2, p. 451-459, 2012.
- PEETERS, C.; ZLOSNIK, J. E. A.; SPILKER, T.; HIRD, T. J.; LIPUMA, H. J.; VANDAMME, L. *P. Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v.36, n.7, p. 483-489, 2013.
- PRITHIVIRAJ, B.; VIKRAM, A.; KUSHALAPPA, A. C.; YAYLAYAN, V. Volatile metabolite profiling for the discrimination of onion bulbs infected by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *Fusarium oxysporum* and *Botrytis allii*. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 110, n. 4, p. 371-377, 2004.
- QUARTIERO, A.; FARIA, M. V.; RESENDE, J. T. V.; FIGUEIREDO, A. S. T.; CAMARGO, L. K. P.; SANTOS, R. L.; KOBORI, R. F. Desempenho agrônômico, heterose e estabilidade fenotípica de genótipos de cebola em Guarapuava. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 259-266, 2014.
- RAMSAY, K. A.; BUTLER, C. A.; PAYTER, S.; WARE, R. S.; KIDD, T. J.; WAINWRIGHT, C. E.; BELL, S. C. Factors Influencing Acquisition of *Burkholderia cepacia* Complex Organisms in Patients with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 12, p. 3975-3980, 2013.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J. J.; TIEDJE, J. M. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. **Applied Environmental Microbiology**. Washington, v. 73, n. 3, p. 201-1193, 2005.

RESENDE, G. M.; COSTA, N. D. **Cultivo de cebola do nordeste: socioeconomia**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 04 Jul. 2016.

REIS, A.; HENZ, G. P.; LOPES, C. A. **Doenças**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/doencas.htm>. Acesso em: 29 mai. 2016.

ROMEIRO, R. S.; OLIVEIRA, J. R.; MELO, L. M. M. Etiologia e transmissão pela semente de uma bacteriose da cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 15, n. 2, p. 221-226, 1993.

SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L.R; MICHEREFF, S. J. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 34-38, 2004.

SENIOR, N. J. GORE, S.; JOHNSON, S. C.; VAITKUTE, G.; MOORE, K. A.; PASZKIEWICZ, K. H.; KADIOGIU, A.; BROWN. Increasing virulence, acute phenotypic adaptations and evolving host-pathogen interactions during chronic *Burkholderia cepacia* complex infection of the cystic fibrosis lung. **Journal of Cystic Fibrosis**, Iowa, v. 14, n. 1, p. 1-80, 2014.

TRANI, P. E.; JÚNIOR, J. M. B.; FACTOR, T. L. **Calagem e adubação da cebola (*Allium cepa* L.)**. Instituto Agrônomo de Campinas, 2014. Disponível em:

<http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/95.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2016.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWER, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; GOVAN, J. R. W. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 47, n. 4, p. 1188-1200, 1997.

VANDAMME, P.; DAWYNDT, P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 34, n. 2, p. 87-95, 2011.

VICENZI, F.J.; PILLONETTO, M.; SOUZA, H. A. P. H. M.; PALMEIRO, J. K.; RIEDI, C. A.; ROSARIO FILHO, N. G.; COSTA, L. M. D. Polyphasic characterization of *Burkholderia cepacia* complex species isolated from children with cystic fibrosis. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 1, p. 37-42, 2016.

VIDA, J. B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMANN, D. J.; BRANDÃO FILHO, U. T.; VERZIGNASSI, J. R.; CAIXETA, M. P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n. 4, p. 355-372, 2004.

WALKER, S.; GOLDBERG, N.; CRAMER, C. **Onion diseases in New Mexico**. New Mexico: New Mexico State University. 2009. 11 p. (Circular, 538).

WRIGHT, P. J.; CLARK, R. G.; HALE, C. N. A storage soft rot of New Zealand onions caused by *Pseudomonas gladioli* pv. *alliicola*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 21, n. 4, p.225-227, 1993.

WORDELL FILHO, J. A.; BOFF, P. Doenças de origem parasitária. In: WORDELL FILHO, J. A.; ROWE, E.; GONÇALVES, P. A. S.; DEBARBA, J. F.; BOFF, P.; THOMAZELLI, L. F. **Manejo fitossanitário da cebola**. Florianópolis: EPAGRI, 2006. P. 19-126.

WORDELL FILHO, J. A.; MARTINS, D. A.; STADNIK, M. J. Aplicação foliar de tratamentos para o controle do míldio e da podridão-de-escamas de bulbos de cebola. **Horticultura brasileira**, Brasília v. 25, n. 4, p. 544-549, 2007.

ZAID, A. M.; BONASERA, J. M.; BEER, S. V. OEM- A new medium for rapid isolation of onion-pathogenic and onion-associated bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 520-526, 2012.

CAPÍTULO II

EPIDEMIOLOGIA DA PODRIDÃO EM ESCAMA DA CEBOLA

Epidemiologia da podridão em escama da cebola

Walkíria, A. Silva, Adriano M. F. Silva, Greecy M. R. Albuquerque, Laboratório de Fitobacteriologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil; **Sami J. Michereff**, Laboratório de Epidemiologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil; **Elineide B. Souza**, Laboratório de Microbiologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil; **Marco A. S. Gama**, Laboratório de Fitobacteriologia, Departamento de Agronomia, Universidade Rural Federal de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

Resumo

A cebola pode ser acometida por várias doenças, destacando-se a podridão em escama causada por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*. O presente trabalho teve como objetivos selecionar e identificar seis isolados deste complexo e determinar a temperatura *in vitro*; avaliar o efeito da concentração de inóculo, temperatura, presença e tempo de exposição à câmara úmida e idade dos bulbos na severidade da podridão em escama da cebola. Por meio da análise da região parcial do gene *recA*, os isolados selecionados para esse estudo foram identificados como *B. cenocepacia* (CRMB31, CRMB109 e CRMB259) e *B. arboris* (CRMB76, CRMB199 e CRMB222). A temperatura ideal de crescimento *in vitro* para os isolados de *B. cenocepacia* foi de 30°C, enquanto para os isolados de *B. arboris* foi de 28°C. As condições que predisuseram a ocorrência de severidades da podridão em escama mais elevadas foram carga de inóculo de 10⁸ UFC/mL, associadas ao período de molhamento de 48 h, temperaturas entre 35 e 40°C e tecidos mais novos. Este é o primeiro relato de *B. arboris* como fitopatogênica e o primeiro estudo realizado para determinação dos fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento da podridão em escama da cebola.

31 A podridão em escamas é uma doença de ocorrência generalizada em cebola (*Allium cepa*
32 L.) que está associada a bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (Palleroni e Holmes)
33 Yabuuchi et al., *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* (Severini) Yabuuchi et al. e *Pseudomonas*
34 *aeruginosa* (Schroeter) Migula (Wordell Filho e Boff, 2006; Oliveira et al. 2016). Por sua vez, o
35 complexo *B. cepacia* é formado por 20 espécies distintas (Vicenzi et al. 2016), porém
36 estreitamente relacionadas, chamadas de genomovares (Vandamme et al., 1997). Contudo, das 20
37 espécies presentes no complexo apenas *B. cepacia*, *B. cenocepacia* e *B. vietnamiensis* estão
38 associadas à podridão em escama da cebola (Mahenthiralingam, Urbant e Goldberg, 2005).

39 A cultura da cebola é de grande importância para a região Nordeste do Brasil que, devido a
40 elevada temperatura e fotoperíodo, é a única região que produz cebola durante todo o ano,
41 permitindo que os produtores programem as safras para os meses em que ocorre menor oferta do
42 produto no mercado interno e, conseqüentemente, os preços sejam mais elevados (Araújo e
43 Correia, 2007). Recentemente foi constatada a presença da podridão de escamas em bulbos
44 oriundos dos principais municípios produtores da região semiárida do Nordeste, localizados em
45 Pernambuco e na Bahia, mais precisamente no Vale do São Francisco, associada a bactérias do
46 complexo *B. cepacia*, *B. gladioli* pv. *alliicola* e *P. aeruginosa*. (Oliveira et al. 2016).

47 Os sintomas da podridão em escama são comuns em bulbos maduros no campo ou
48 armazenados (Wordell Filho, Martins e Stadnik, 2007). No pseudocaule e nas escamas externas
49 caracterizam-se por uma podridão amarelada, viscosa e escorregadia ao tato (Gava e Tavares,
50 2007). Escamas adjacentes às infectadas podem permanecer firme e, embora a podridão seja
51 observada nas escamas individualmente, todo o bulbo é comprometido (Davis et al. 2014;
52 Roberts, 2013). Além disso, bulbos doentes deixam normalmente odor avinagrado (Wordell Filho
53 et al. 2006). É importante mencionar que embora as perdas em decorrência da doença possam
54 ocorrer durante o armazenamento, a infecção geralmente ocorre no campo, após a formação dos
55 bulbos (Parke e Gurian-Shernan, 2001).

56 Apesar da importância da podridão em escama da cebola, pesquisas sobre a epidemiologia
57 desta doença ainda não foram realizadas. A epidemiologia é uma ferramenta importante para
58 ampliar o entendimento de como as doenças ocorrem nas plantas hospedeiras e para detectar quais
59 os fatores que favorecem o seu desenvolvimento (Silva et al. 2015). Sabe-se que a intensidade e
60 frequência das doenças são significativamente influenciadas pelo grau de desvio de cada condição
61 ambiental do ponto no qual o progresso da doença é máximo (Silveira et al. 2004). Nesse sentido,

62 para o progresso das doenças a temperatura tem um importante papel regulatório, já que
63 temperaturas limitantes aos fitopatógenos raramente ocorrem em regiões tropicais e subtropicais
64 (Martins e Amorim, 1999). A umidade, em termos de quantidade e duração, também é importante
65 para o processo de infecção de grande parte dos fungos e bactérias fitopatogênicas (Silva et al.
66 2001). Outro fator preponderante no processo infeccioso é a quantidade de inóculo viável, cujo
67 aumento da concentração normalmente tende ao aumento do nível ou taxa de infecção (Oliveira et
68 al. 2014). Portanto, o entendimento dos fatores ambientais chave que afetam o desenvolvimento
69 de epidemias de doenças de plantas é essencial para analisar e implementar estratégias efetivas
70 para o manejo da doença (De Wolf e Isard, 2007). No caso da podridão em escamas, por se tratar
71 de uma doença de ocorrência no campo e na pós-colheita, também é importante determinar a
72 influência da idade do bulbo na epidemiologia da doença.

73 Diante do desconhecimento sobre a epidemiologia da podridão em escamas da cebola, este
74 trabalho teve como objetivo avaliar a epidemiologia da doença sob a influência da temperatura,
75 umidade, idade do bulbo e concentração de inóculo de diferentes isolados do complexo *B. cepacia*
76 associados à podridão em escamas no Vale do São Francisco.

77

78 MATERIAL E MÉTODOS

79

80 **Isolados bacterianos.** Foram selecionados isolados do complexo *B. cepacia* previamente
81 classificados como altamente (CRMB76 e CRMB199), moderadamente (CRMB31 e CRMB259)
82 e pouco agressivos (CRMB109 e CRMB222) (Oliveira et al. 2016). Esses isolados foram obtidos
83 de bulbos de cebola apresentando sintomas de podridão em escama no Vale do São Francisco e
84 encontram-se atualmente depositados na Coleção de Cultura Rosa Mariano (CRM) do Laboratório
85 de Fitobacteriologia da UFRPE. Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados em
86 duplicata.

87

88 **Identificação dos isolados.** A identificação dos isolados foi realizada por meio do
89 sequenciamento e análise filogenética da sequência parcial do gene *recA* (gene de recombinação e
90 reparo de DNA). A extração do DNA dos isolados foi realizada a partir do crescimento bacteriano
91 com 36h, utilizando-se o Kit MiniPrep para extração de DNA genômico bacteriano (Axygen
92 Biosciences, Massachusett, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para amplificação

93 de um fragmento de 376 pb foram utilizados os *primers* BUR3 (GARAAGCAGTTCGGCAA) e
94 BUR5 (CGATCATGTTCGATCGARC). As reações foram compostas por: 1X de PCR Master mix
95 2X (0,05 U/ μ l de Taq DNA polimerase, tampão de reação, 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada
96 dNTP), 8 μ L de cada *primer*, 10 μ L de DNA e 8 μ L de DMSO. As amostras foram amplificadas
97 em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, Estados Unidos), sendo realizadas em dois
98 estádios: o primeiro estádio foi constituído por 48 ciclos de 95°C por 30 seg, 65°C por 30 seg e
99 72°C por 3 min e o segundo estádio, por 15 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 40 seg e 72°C
100 por 40 seg, seguindo-se uma extensão final com um ciclo de 72°C por 3 min. Controles negativos
101 (reações livres de DNA) foram incluídos para verificar a presença de contaminantes. Os
102 sequenciamentos das fitas *forward* e *reverse* foram realizados pela Macrogen[®] (Seul, Coréia do
103 Sul). A análise da qualidade das sequências de nucleotídeos e a montagem dos contigs foram
104 realizadas com auxílio do Staden Package (Staden et al. 1998). Os alinhamentos das sequências
105 foram realizados com a ferramenta ClustalW, implementada no software MEGA v.6.0. Foram
106 realizadas análises de Inferência Bayesiana utilizando-se modelos de substituição de nucleotídeos
107 selecionados por meio do critério de informações bayesiano (bayesian information criterion -
108 BIC) com o auxílio do JModelTest 2.1.3.

109

110 **Temperatura ideal de crescimento *in vitro* dos isolados.** Com auxílio de espectrofotômetro
111 (Analyser 500 M, Brasil), foram preparadas suspensões dos seis isolados estudados para $A_{570} =$
112 0,54, o que corresponde a 10^8 UFC/mL. Aliquotas de 0,5 mL das suspensões bacterianas foram
113 dispensadas em tubos de ensaio contendo 4,5 mL de meio de cultura NYD (10 g de dextrose; 5 g
114 de extrato de levedura; 3 g de extrato de carne e 5 g de peptona, completando-se até 1000 mL com
115 água destilada). Posteriormente, os isolados foram incubados em estufa tipo B.O.D.
116 (Biochemistry Oxygen Demand) nas temperaturas de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C durante 48
117 h. Após a incubação, o crescimento dos isolados nas diferentes temperaturas foi avaliado em
118 espectrofotômetro a 570 nm, lendo-se a absorbância das suspensões. O delineamento
119 experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída
120 por um tubo de ensaio.

121

122 **Influência da concentração do inóculo sobre a podridão em escama.** Os isolados foram
123 cultivados em meio NYDA (NYD acrescido de 20 g de ágar) por 36 h a 30°C e a concentração
124 das suspensões bacterianas foram ajustadas para 10^8 UFC/mL, seguindo-se a realização de
125 diluições em séries até a concentração de 10^6 UFC/mL, conforme descrito por Souza et al. (2016).
126 Com auxílio de uma almofada de alfinetes entomológicos foram realizados ferimentos de
127 aproximadamente 2,5 mm de profundidade em catafilos destacados de cebola, e sobre o
128 ferimento, foram depositados 10 μ L das suspensões bacterianas nas concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8
129 UFC/mL. Catafilos tratados similarmente com água destilada esterilizada (ADE) constituíram o
130 controle negativo. Após a inoculação, os catafilos foram dispostos sobre placas de Petri e as
131 placas colocadas dentro de bandejas de plástico, sendo as bandejas recobertas com sacolas
132 plásticas transparentes para criação de uma câmara úmida. Em seguida, as bandejas foram
133 acomodadas em B.O.D. a temperatura de 30°C por 48 h.

134 As avaliações foram realizadas em intervalos de seis em seis horas até 48 h após a
135 inoculação (6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h) determinando-se os seguintes componentes
136 epidemiológicos: a) período de incubação (PI), calculado pelo número de horas entre a
137 inoculação e o surgimento dos sintomas da doença; b) severidade, estimada pela medição das
138 lesões com auxílio de um paquímetro; e c) área abaixo da curva de progresso da doença
139 (AACPD), calculada com base nos dados de severidade pela expressão: $AACPD = \sum$
140 $(y_i + y_{i+1})/2 \cdot d_{ti}$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de severidade observados em duas avaliações
141 consecutivas e d_{ti} o intervalo entre as avaliações (Shaner e Finney, 1977).

142 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial duplo (seis
143 isolados e três concentrações de inóculo), com cinco repetições, sendo cada repetição constituída
144 por três catafilos contendo um ponto de inoculação.

145

146 **Efeito da temperatura sobre a podridão em escama.** Os isolados foram cultivados em meio
147 NYDA por 36 h a 30°C e a concentração das suspensões bacterianas foram ajustadas para 10^8
148 UFC/mL. As inoculações foram realizadas conforme descrito anteriormente e os catafilos
149 mantidos em B.O.D. nas temperaturas 30, 35, 40°C com câmara úmida por 48 h. As avaliações
150 foram realizadas conforme descrito anteriormente. O delineamento experimental foi inteiramente
151 casualizado em arranjo fatorial duplo (seis isolados e três temperaturas), com cinco repetições,
152 sendo cada repetição constituída por três catafilos contendo um ponto de inoculação.

153 **Influência da presença de câmara úmida sobre a podridão em escama.** Os catafilos foram
154 inoculados com as suspensões bacterianas (10^8 UFC/mL) conforme descrito anteriormente, sendo
155 submetidos ou não a tratamento com câmara úmida durante 48 h. Após a inoculação, foi realizada
156 a incubação em B.O.D. na temperatura de 35°C. As avaliações foram realizadas conforme
157 descrito anteriormente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo
158 fatorial duplo (seis isolados e duas condições de umidade), com cinco repetições, sendo cada
159 repetição constituída por três catafilos contendo um ponto de inoculação.

160

161 **Influência da amplitude do período de molhamento sobre a podridão em escama.** Os
162 catafilos foram inoculados com as suspensões bacterianas (10^8 UFC/mL) conforme descrito
163 anteriormente, sendo posteriormente submetidos a tratamento em câmara úmida durante 6, 24 e
164 48 h. Os diferentes períodos de molhamento foram obtidos por meio da retirada da câmara úmida
165 após cada tempo estipulado. As avaliações foram realizadas conforme descrito anteriormente. Os
166 experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado em
167 arranjo fatorial duplo (seis isolados e três períodos de molhamento), com cinco repetições, sendo
168 cada repetição constituída por três catafilos contendo um ponto de inoculação.

169

170 **Efeito da idade do bulbo sobre a podridão em escama.** Catafilos de cebola com idade de 90,
171 100 e 110 dias foram inoculados conforme descrito anteriormente. Após as inoculações, os
172 catafilos foram incubados em B.O.D. com câmara úmida durante 48 h. As avaliações foram
173 realizadas conforme descrito anteriormente. O delineamento experimental foi inteiramente
174 casualizado em arranjo fatorial duplo (seis isolados e três idades dos bulbos) com cinco
175 repetições, sendo cada repetição constituída por três catafilos contendo um ponto de inoculação.

176

177 **Análise estatística.** Para determinação da temperatura ideal de crescimento *in vitro* dos isolados
178 os dados gerados para cada isolado foram analisados individualmente por meio do Table Curve
179 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA). As variáveis analisadas foram submetidas à análise
180 de correlação de Pearson ($P \leq 0.05$) e os dados obtidos em cada experimento foram submetidos à
181 Análise de Variância (ANOVA). Posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de
182 Diferença Mínima Significativa (DMS) ($P \leq 0.05$). As análises foram realizadas com auxílio do
183 programa Statistix (versão 9.0, Analytical Software Tallahassee).

184

185 RESULTADOS

186

187 **Identificação através da sequência parcial do gene *recA*.** A árvore filogenética obtida por meio
188 de Inferência Bayesiana demonstrou que os isolados CRMB31, CRMB109 e CRMB259
189 pertencem à espécie *B. cenocepacia*, enquanto os isolados CRMB76, CRMB199 e CRMB222
190 pertencem à espécie *B. arboris* (Fig. 1). Dessa forma, os isolados de *B. cenocepacia* foram
191 renomeados como CRMBC31, CRMBC109 e CRMBC259 e os isolados de *B. arboris* como
192 CRMBA76, CRMBA199 e CRMBA222.

193

194 **Temperatura ideal de crescimento *in vitro*.** A temperatura ideal de crescimento *in vitro* para os
195 isolados de *B. cenocepacia* foi de 30°C, enquanto para os isolados de *B. arboris* foi de 28°C
196 (dados não apresentados).

197

198 **Influência da concentração do inóculo sobre a podridão em escama.** Foi observada correlação
199 positiva significativa ($P \leq 0.05$) entre a severidade e a AACPD ($r = 0.92$) e correlação negativa
200 significativa entre o PI e a severidade ($r = - 0.77$) e a AACPD ($r = - 0.89$). Portanto, tendo em
201 vista a ocorrência de correlações significativas entre todas as variáveis analisadas, para os demais
202 experimentos apenas a severidade da doença foi calculada. Foi observada interação significativa
203 ($P \leq 0.05$) entre os isolados e as concentrações de inóculo. A severidade da podridão em escama
204 aumentou significativamente com o incremento da concentração do inóculo de 10^6 a 10^8 UFC/mL.
205 Nas três concentrações testadas o isolado CRMBC109 induziu uma severidade menor que as
206 induzidas pelos demais isolados. Na concentração de 10^8 UFC/mL, o isolado CRMBA76 causou
207 lesões significativamente maiores (Tabela 1). Para os isolados CRMBA199, CRMBA222,
208 CRMBC31 e CRMBC259 não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações
209 10^7 e 10^8 UFC/mL.

210

211 **Efeito da temperatura sobre a podridão em escama.** Não foi observada interação significativa
212 ($P \leq 0.05$) entre os isolados e as temperaturas analisadas. Portanto, independentemente do isolado
213 analisado foi observado que a severidade da doença foi maior nas temperaturas de 35 e 40°C, as
214 quais diferiram significativamente do tratamento a 30°C (Fig. 2).

215

216 **Influência da presença de câmara úmida sobre a podridão em escama.** Foi observada
217 interação significativa ($P \leq 0.05$) entre os isolados e a presença de câmara úmida. Nesse sentido, a
218 presença de câmara úmida aumentou de forma significativa ($P \leq 0.05$) a severidade da doença para
219 todos os isolados, exceto para o isolado CRMBC109 o qual apresentou a mesma média tanto na
220 presença como na ausência da câmara úmida (Tabela 2). Os isolados CRMBC31, CRMBA76,
221 CRMBA199 e CRMBA222 apresentaram os maiores valores de severidade em condições de
222 câmara úmida. Por sua vez, na ausência de câmara úmida os isolados CRMBC31, CRMBA76,
223 CRMBA199 e CRMBC259 induziram uma maior severidade da doença.

224

225 **Influência da amplitude do período de molhamento sobre a podridão em escama.** Não foi
226 observada interação significativa ($P \leq 0.05$) entre os isolados e os períodos de molhamento (6, 24 e
227 48 h). Portanto, independentemente do isolado analisado foi observado que a amplitude do
228 período de molhamento influenciou a severidade da doença, sendo observado um aumento
229 significativo ($P \leq 0.05$) na medida em que a exposição dos catafilos ao período de molhamento
230 aumentou (Fig. 3).

231

232 **Efeito da idade do bulbo na severidade da podridão em escama da cebola.** Foi observada
233 interação significativa ($P \leq 0.05$) entre os isolados e a idade dos bulbos. De maneira geral,
234 severidades significativamente mais altas ($P \leq 0.05$) foram observadas em bulbos com 90 e 100
235 dias de idade do que em bulbos com 110 dias (Tabela 3). O isolado CRMBA76 induziu a uma
236 maior severidade quando inoculado em bulbos com 90 dias, enquanto aos 100 dias os isolados
237 CRMBC31, CRMBA222 e CRMBC259 induziram maiores lesões. Em bulbos com 110 dias de
238 idade, os isolados CRMBA76 e CRMBC31 induziram as maiores lesões, diferindo
239 significativamente dos demais.

240

241 **DISCUSSÃO**

242

243 A podridão em escama é uma doença de ocorrência generalizada em cultivos de cebola e
244 está associada a isolados do complexo *B. cepacia*, *B. gladioli* pv. *alliicola* e *P. aeruginosa*
245 (Wordell Filho; Boff, 2006). Essas bactérias foram recentemente detectadas no Vale do São
246 Francisco causando podridão em escamas, sendo observada uma maior ocorrência e agressividade
247 de isolados do complexo, embora as espécies não tenham sido identificadas (Oliveira et al. 2016).

248 No presente estudo, seis isolados do complexo classificados previamente por Oliveira et
249 al. (2016) como altamente (CRMB76 e CRMB199), moderadamente (CRMB31 e CRMB259) e
250 pouco agressivos (CRMB109 e CRMB222) foram selecionados para investigar a influência da
251 temperatura, umidade, idade do bulbo e concentração do inóculo na habilidade do patógeno em
252 infectar cebolas. Esses isolados foram identificados por meio de sequenciamento e análise
253 filogenética do gene *recA*. A exploração desse gene tem demonstrado a grande eficiência desse
254 locus para identificação de espécies do complexo (Martins, 2007). Além disso, utilizando esse
255 gene Ginther et al. (2015) foram capazes de identificar espécies de *Burkholderia* pertencentes e
256 não pertencentes ao complexo *B. cepacia*. Portanto, utilizando essa metodologia foi possível
257 identificar de forma bem sucedida os isolados CRMBA76, CRMBA199 e CRMBA222 como *B.*
258 *arboris* e CRMBC31, CRMBC109 e CRMBC259 como *B. cenocepacia*. Até o momento, apenas
259 *B. ambifaria*, *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia* (Jacobs et al. 2008;
260 Lee e Chan, 2007; Mahenthiralingam; et al. 2005; Wordel Filho e Boff, 2006) haviam sido
261 descritas como capazes de causar doenças em plantas. Portanto, para o nosso conhecimento essa é
262 a primeira vez que *B. arboris* é encontrada em associação com a podridão em escamas da cebola.

263 Para atingir o máximo de crescimento, uma bactéria necessita, entre outros fatores, de
264 condições ideais de temperatura (Nascimento et al. 2005). Portanto, antes da realização dos
265 experimentos conduzidos para analisar o comportamento epidemiológico da podridão em escamas
266 causada por isolados do complexo *B. cepacia*, foi calculada a temperatura ideal de crescimento *in*
267 *vitro* dos isolados, a qual foi de 30°C para *B. cenocepacia* e 28°C para *B. arboris*. Diante desses
268 resultados, a temperatura de 30°C foi selecionada como temperatura padrão para cultivo dos
269 isolados para o posterior preparo das suspensões bacterianas. Além disso, as temperaturas ideais
270 obtidas no presente estudo corroboram com aquelas descritas para isolados do complexo *B.*
271 *cepacia* (30 a 35°C) (Bazzi, 1970) e especificamente para *B. arboris* (30 a 37°C), embora essa
272 espécie apresente isolados capazes de crescer até 42°C (Vanlaere et al. 2008).

273 Para avaliar o comportamento epidemiológico da podridão em escamas da cebola foram
274 inicialmente estudadas as variáveis PI, severidade e AACPD, as quais foram estimadas no
275 experimento para determinação da influência da concentração do inóculo sobre a doença. Foram
276 observadas correlações positivas entre a severidade e a AACPD e correlações negativas entre
277 essas variáveis e o PI, indicando que qualquer uma dessas variáveis pode ser utilizada em
278 pesquisas envolvendo epidemiologia da podridão em escamas, o que também já foi observado em

279 outras doenças bacterianas (Nascimento et al. 2006). Por esse motivo, optou-se por utilizar apenas
280 a variável severidade nos demais estudos do presente trabalho.

281 Embora no experimento para avaliação da influência da concentração do inóculo sobre a
282 podridão em escama tenha havido interação significativa entre os isolados e as concentrações
283 analisadas, as maiores severidades foram observadas nas concentrações de 10^7 e 10^8 UFC/mL.
284 Uma vez que a quantidade de inóculo é um pré-requisito para o surgimento de infecções, a
285 ocorrência de epidemias em diversos patossistemas em um curto espaço de tempo está
286 diretamente ligada ao número de propágulos do patógeno dentro ou próximo dos campos com
287 plantas hospedeiras (Sussel et al. 2011). Portanto, os resultados obtidos neste estudo indicam que
288 quanto maior for a carga de inóculo, maior será a severidade da podridão em escamas.

289 O fator temperatura é frequentemente correlacionado com a epidemiologia da doença,
290 seguida pela umidade e luz (Andrade et al. 2007). Embora não existam estudos sobre a influência
291 da temperatura na severidade da podridão em escamas da cebola, a temperatura ótima da doença é
292 descrita como sendo entre 30 e 35°C (Wordel Filho e Boff, 2006). No entanto, no presente estudo
293 foi verificada uma severidade maior nas temperaturas de 35 e 40°C, discordando dos resultados
294 descritos anteriormente (Wordel Filho e Boff, 2006). Não foi verificada interação significativa
295 entre isolados e temperatura, mostrando que os níveis de severidade entre os isolados se
296 comportou da mesma forma, independentemente da temperatura. Para algumas doenças
297 bacterianas tem sido relatado que a severidade depende, dentre outros fatores, do isolado e da
298 temperatura (Ibrahim et al. 1978).

299 Além da temperatura, o aumento da incidência de doenças no campo também é favorecido
300 pela ocorrência de alta umidade (Gava e Tavares, 2007). Portanto, para verificar se a umidade é
301 um fator primordial para o início da infecção da podridão em escamas, inicialmente foi analisado
302 se haveria diferença entre a severidade da doença na presença ou não de câmara úmida. Embora
303 tenha sido observada interação significativa ($P \leq 0.05$) entre os isolados e a presença de câmara
304 úmida, constatou-se que a presença de umidade aumentou de forma significativa a severidade da
305 doença para maioria dos isolados. A influência da umidade na epidemiologia da podridão em
306 escamas foi reforçada com os resultados obtidos na avaliação da influência da amplitude do
307 período de molhamento sobre a doença, que demonstraram que quanto maior foi o tempo de
308 exposição dos catafilos a câmara úmida, maior foi a severidade. Tais constatações concordam

309 com Gava e Tavares (2007), os quais citam que as principais condições climáticas favoráveis ao
310 desenvolvimento da podridão em escama são alta umidade e temperaturas elevadas.

311 Embora Walker et al. (2009) afirme que a doença ocorre em bulbos maduros, no presente
312 estudo foi possível verificar que a idade dos bulbos não esta totalmente relacionada à ocorrência
313 da podridão em escama, pois todos os isolados foram capazes de provocar a doença em catafilos
314 de todas as idades. Além disso, contrariando a informação de que bulbos maduros são mais
315 suscetíveis a doença, foi verificado que para a maioria dos isolados estudados catafilos de bulbos
316 mais novos, com 90 dias, foram mais susceptíveis a podridão em escama do que bulbos com 110
317 dias. A maior incidência da doença no campo na ocasião em que os bulbos estão mais maduros
318 está correlacionada a outros fatores distintos da susceptibilidade dos tecidos da cebola. Segundo
319 Soares et al. (2004), bulbos de cebola colhidos tardiamente reduzem a firmeza dos mesmos e
320 aumentam a incidência de doenças no armazenamento. Portanto, tecidos mais firmes como
321 aqueles encontrados em tecidos mais novos e, conseqüentemente, menos propensos a ferimentos
322 podem ser o verdadeiro fator responsável por essa aparente resistência. Adicionalmente, é
323 importante ressaltar que a idade de órgãos vegetais não é determinante para que ocorra infecção
324 em outros patossistemas. Por exemplo, para frutos de meloeiro a idade não é um fator
325 determinante para a elevação ou redução da severidade da podridão em cratera (Senhor et al.
326 2008), mas é para a mancha aquosa, uma vez que frutos mais velhos inoculados artificialmente
327 com *Acidovorax citrulli* são mais afetados do que frutos mais jovens (Silveira et al. 2004).

328 Os isolados estudados no presente trabalho foram anteriormente classificados por Oliveira
329 et al. (2016) como altamente (CRMB76 e CRMB199), moderadamente (CRMB31 e CRMB259) e
330 pouco agressivos (CRMB109 e CRMB222). No entanto, considerando os resultados dos
331 diferentes experimentos esse comportamento não foi observado. Essa contradição entre resultados
332 pode ser explicada pela existência de uma possível compensação dos diferentes níveis de
333 agressividade dos isolados em função da interação entre os isolados e as diferentes condições
334 ambientais, mecanismos de adaptação e substituição ou balanceamento de fatores ecológicos ou
335 bióticos (Aust, Bashi, Rotem, 1980).

336 Com base nos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluir que as condições
337 que predispõem a ocorrência de severidades mais altas da podridão em escama da cebola são
338 elevada carga de inóculo dos patógenos em conjunto com alta umidade, temperaturas entre 35 e
339 40°C e tecidos mais novos dos bulbos. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo

340 realizado para determinação dos fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento da podridão
 341 em escama da cebola. Adicionalmente, foi identificada *B. arboris* causando doença em cebola,
 342 sendo o primeiro relato dessa espécie como fitopatogênica. As informações obtidas aqui serão
 343 úteis para o entendimento de epidemias da podridão em escama e auxiliarão a implementação de
 344 estratégias para o controle da doença.

345

346 AGRADECIMENTOS

347

348 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa
 349 de Mestrado concedida a W. A. M. Silva e pela bolsa de produtividade da pesquisadora E. B.
 350 Souza e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE),
 351 pela bolsa de Pós-doutorado concedida a A. M. F. Silva.

352

353 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

354

- 355 Andrade, G. C. G., Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Zauza, E. A. V., Couto, M. M. F., e Mafia, L. A. 2007.
 356 Características Culturais e Severidade da Mancha Foliar de Quambalaria eucalypti Sob Diferentes Regimes de
 357 Temperatura, Luz e Período de Molhamento Foliar. Fitopatol. Bras., 32: 329-334.
- 358 Araújo, J. L. P.; Correia, R. C. 2007. Custos. In: Cultivo da cebola no nordeste. Costa, N. D., e Resende, G. M. ed.
 359 Embrapa Semiárido, Petrolina.
- 360 Aust, H. J., Bashi, E., e Rotem, J. 1980. Flexibility of plant pathogens in exploiting ecological and biotic conditions
 361 in the development of epidemics. 46-56. In: Comparative epidemiology. ed. Palti, J. A tool for better disease
 362 management. Munich.
- 363 Bazzi, C. 1979. Identification of *Pseudomonas cepacia* on onion bulbs in Italy. Phytopathol. Z., 95: 254-258.
- 364 Davis, R. M., Aegerter, B. J., Laemmlen, F. F., e Voss, R. E. 2014. Onion and garlic, bacterial soft rot, Pathogens:
 365 *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Pseudomonas gladioli*, and *Enterobacter cloacae*. UC
 366 Pest Management Guidelines. California: University of California. Acesso em 07 set. 2015.
- 367 De Wolf, E. D. e Isard, S. A. 2007. Disease cycle approach to plant disease prediction. Annu. Rev. Phytopathol., 45:
 368 203-220.
- 369 Gava, C. A. T. e Tavares, S. C. H. 2007. Doenças. In: Costa, N. D. e Resende, G. M. Cultivo da cebola no Nordeste.
 370 Embrapa, Semiárido.
- 371 Ginther, J. L., Mayo, M., Warrington, S. D., Kaestli, M., Mullins, T., Wagner, D. M., Wagner, D. M., Currie, B. J.,
 372 Tuanyok, A. Keim, P. 2015. Identification of *Burkholderia pseudomallei* Near-Neighbor Species in the Northern
 373 Territory of Australia. PLOS Neglected Trop. Dis. 1-13.
- 374 Ibrahim, M., Jouan, R., Samson, R., Poutier, F. e Saily, M. 1978 Prospects of pathogenicity test concerning *Erwinia*
 375 *carotovora* var. *carotovora* and *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*, on half potato tubers, variation according
 376 to variety of bacterial species and strains, inoculum dose, temperature, variety of potatoes, physiological age of
 377 tubers and delay between injury and inoculation. Proceedings of the IVth Inter. Conferen. on Plant Pathog.
 378 Bacteria. 2: 591-602.
- 379 Jacobs, J. L., Fasi, A. C., Ramette, A., Smith, J. J., Hammerschmidt, R., e Sundin, G. W. 2008. Identification and
 380 Onion Pathogenicity of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates from the Onion Rhizosphere and Onion Field
 381 Soil. Appl. Environ. Microbiol., 74: 3121-3129.
- 382 Leite, D. L. produção de sementes de cebola. 2014. Pelótas: embrapa clima temperado, 2014. 142: 9.

- 383 Lee, Y. A., and C. W. Chan. 2007. Molecular typing and presence of genetic markers among strains of banana finger-
384 tip rot pathogen, *Burkholderia cenocepacia*, in Taiwan. *Phytopathology* 97:195-201.
- 385 Maia, M. C. C., Pedrosa, J. F., Torres Filho, J., Negreiros, M. Z., e Bezerra Neto, F. 2000. Características de
386 qualidade de cebola múltipla durante armazenamento sob condição ambiental não controlada. *Hort. Bras.* 18:
387 61-64.
- 388 Mahenthiralingam, E., Urbant, T. A., Goldberg, J. B. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia*
389 complex. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 144-156.
- 390 Martins, K. M. 2007. Avaliação microbiológica e epidemiológica de ceas do complexo Burkholderiacepacia isoladas
391 de pacientes com fibrose cística. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de medicina da
392 universidade de são Paulo, São Paulo.
- 393 Martins, M. C. e Amorim, L. 1999. Efeito do período de molhamento foliar em componentes monocíclicos da
394 ferrugem do pessegueiro. *Fitopatol. Bras.* 24: 552-555.
- 395 Nascimento, A. R. P., Mariano, R. L. R. e Gama, M. A. S. 2005. Métodos de prevenção e crescimento de
396 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* me meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl.
397 *Fitopatol. Bras.* 30: 650-654.
- 398 Nascimento, A. R. P., Michereff, S. J., Mariano, R. L. R., Viana, I. O. 2006. Reação de clones de videira a
399 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. *Ciênc.*
400 *Rural.* 36: 1-7.
- 401 Oliveira, T, A, S., Blum, L. E. B., Duarte, E. A. A., Tavares, G. M., Luz, E. D. M. N. 2014. Fatores epidemiológicos
402 de *Phytophthora palmivora* afetando a severidade da podridão-dos-frutos do mamoeiro na pós-colheita.
403 *Summa phytopathol.* 40: 256-263.
- 404 Oliveria, W. J. Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido brasileiro. 2016, 58f. Dissertação (Mestrado
405 em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- 406 Parke, J. L. e Gurian-Sherman, D. 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* Complex and implications for risk
407 assessment of biological control strains. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39: 225-58.
- 408 Roberts, S. 2013. Bacterial storage rots in onion caused by *Burkholderia gladioli* pv. *aliicola*. Warwick: Plant Health
409 Solution, 2013. Acesso em: 12 mai. 2016.
- 410 Santos, S. S., Espíndola, J. A. A., Guerra, J. G., Leal, M. A. A., e Ribeiro, R. L. D. 2012. Produção de cebola
411 orgânica em função do uso de cobertura morta e torta de mamona. *Hortic. Bras.* 30: 549-552.
- 412 Senhor, R. F., Câmara, M. P. S., Prichoa, L. F., Lima, M. B., Sales Junior, R., e Michereff, S. J. 2008. Influência do
413 método de inoculação, intensidade do fermento e idade do fruto na severidade da podridão-de-cratera em
414 melão. *Summa Phytopathol.* 34: 232-237.
- 415 Shaner, R. G., Finney, R. E. 1997. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance
416 in Knox wheat. *Phytopathology.* 67: 1051-1056.
- 417 Silva, S. R., Rios, G. P., e Silva, S. C. 2001. Influencia da resistência e do período de molhamento na infecção e
418 desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. *Fitopatol. Bras.*, 26: 726-731.
- 419 Silva, M. A., Lima, G. S. A., Assunção, I. P., Laranjeira, F. F., e Michereff, S. J. 2015. Progresso e arranjo espacial
420 do mosaico dourado em fava. *Rev. Caatin.* 28: 19-27.
- 421 Silveira, E. B., Mariano, R. L.R, e Michereff, S. J. 2004. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo
422 de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão.
423 *Fitopatol. Bras.* 29: 34-38.
- 424 Staden, R., Beal, K. F., and Bonfield, J.K. 1998. The Standen Package. In: *Bioinformatics methods and protocols.*
425 Misener S. and Krawetz, S. A. Hulmana Press. 1: 115-130.
- 426 Soares, V. L. F., Finger, L. F., e Mosquim, P. R. 2004. Influência do genótipo e do estágio de maturação na colheita
427 sobre a matéria fresca, qualidade e cura dos bulbos de cebola, *Horti. Bras.* 22: 18-22.
- 428 Souza, E. B. Mariano, R. L. R. e Felix, K. C. S. 2016. Isolamento de bactérias fitopatogênicas. In. Mariano, R. L. R.,
429 Silveira, E. B. Manual de práticas em fitobacteriologia. 3ª ed., Recife: UFRPE, p. 25-36.
- 430 Sussel, A. A. B., Pozza, E. A., Castro, H.A., e Lasmar, E.B.C. 2011. Incidência e severidade do mofo-cinzeno-da-
431 mamoneira sob diferentes temperaturas, períodos de molhamento e concentração de conídios. *Summa*
432 *Phytopathol.* 37: 30-34.
- 433 Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H.; Lauwer, S.; Gillis, M.;
434 Kersters, K., Govan, J. R. W. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic
435 fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 47: 1188-1200.
- 436 Vanlaere, E., LiPuma, J. J., Baldwin, A., Henry, D., Brandt, E., Mahenthiralingam, E., Speert, Dowson, C.,
437 Vandamme, P. 2008. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov.,

- 438 *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia*
439 *cepacia* complex. Jour. of Systemat. and Evolut. Microb, 58: 1580-1590.
- 440 Vicenzi, F. J., Pilonetto, M. S., Souza, H. A. P. H. M., Palmeiro, J. K., Riedi, C.A., Rosario Filho, N. G., Costa, L.
441 M. D. 2016. Polyphasic characterization of *Burkholderia cepacia* complex species isolated from children with
442 cystic fibrosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 111: 37-42.
- 443 Walker, S., Goldberg, N. e Cramer, C. 2009 Onion diseases in New Mexico. New Mexico: New Mexico State
444 University. 538: 11.
- 445 Wordell Filho, J. A.; Martins, D. A.; Stadnik, M. J. 2007. Aplicação foliar de tratamentos para o controle do mildio e
446 da podridão-de-escamas de bulbos de cebola. Hort. bras.25: 544-549.
- 447 Wordell Filho, J. A., and Boff, P. 2006. Doenças de origem parasitária. Pages 19-126 In: Manejo fitossanitário da
448 cebola. Wordell Filho, J. A., Rowe, E., Gonçalves, P. A. S., Debarba, J. F., Boff, P., and Thomazelli, L.F.
449 EPAGRI, Florianópolis.
- 450

451 **Tabela 1.** Influência da concentração do inóculo de isolados de *Burkholderia cenocepacia*
 452 (CRMBC) e *Burkholderia arboris* (CRMBA) no tamanho da lesão (cm) em catafilos de cebola

| Isolado | 10 ⁶ | 10 ⁷ | 10 ⁸ |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CRMBA 76 | 1,2 aB* | 1,4 aB | 2,2 aA |
| CRMBA 199 | 1,1 aC | 1,4 aAB | 1,6 bcA |
| CRMBA 222 | 1,0 abB | 1,1 bAB | 1,3 cA |
| CRMBC 31 | 1,3 aB | 1,5 aAB | 1,6 bcA |
| CRMBC 109 | 0,3 cC | 0,8 bB | 1,1 cA |
| CRMBC 259 | 1,2 aB | 1,4 aAB | 1,6 bcA |

C.V. (%) = 18,24

453 *Média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na
 454 linha não diferem significativamente entre si pelo teste de DMS (P≤0.05).

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474 **Tabela 2.** Influência da presença de câmara úmida sobre lesões (cm) causadas por isolados de
 475 *Burkholderia cenocepacia* (CRMBC) e *Burkholderia arboris* (CRMBA) em cebola catafilos de
 476 cebola

| Isolado | Câmara Úmida | |
|------------------|--------------|----------|
| | Com (48h) | Sem (0h) |
| CRMBC31 | 3,7 aA* | 2,0 aB |
| CRMBC109 | 0,9 cA | 0,9 cA |
| CRMBC259 | 3,0 bA | 1,9 aB |
| CRMBA76 | 3,5 aA | 1,7 abB |
| CRMBA199 | 3,5 aA | 1,8 abB |
| CRMBA222 | 3,4 aA | 1,4 bB |
| C.V. (%) = 21,13 | | |

477 *Média de 10 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na
 478 linha não diferem significativamente entre si pelo teste de DMS ($P \leq 0.05$).

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492 **Tabela 3.** Influência da idade de bulbos de cebola no desenvolvimento de lesões (cm) causadas
 493 por *Burkholderia cenocepacia* (CRMBC) e *Burkholderia arboris* (CRMBA) em catafilos de
 494 cebola

| Isolado | Idade do Bulbo (dias) | | |
|----------|-----------------------|---------|--------|
| | 90 | 100 | 110 |
| CRMBA76 | 3,5 aA* | 2,6 bB | 2,9 Ab |
| CRMBA199 | 2,7 bcA | 2,7 bA | 2,1 Bb |
| CRMBA222 | 3,0 bcA | 3,0 abA | 2,1 bB |
| CRMBC31 | 3,0* bcA | 3,3 aA | 2,9 Aa |
| CRMBC109 | 1,0 dA | 1,2 cA | 1,0 Ca |
| CRMBC259 | 3,1 abA | 3,1 aA | 2,7 aB |

C.V. (%) = 18,75

495 *Média de 10 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na
 496 linha não diferem significativamente entre si pelo teste de DMS ($P \leq 0.05$).

497

498

499

500

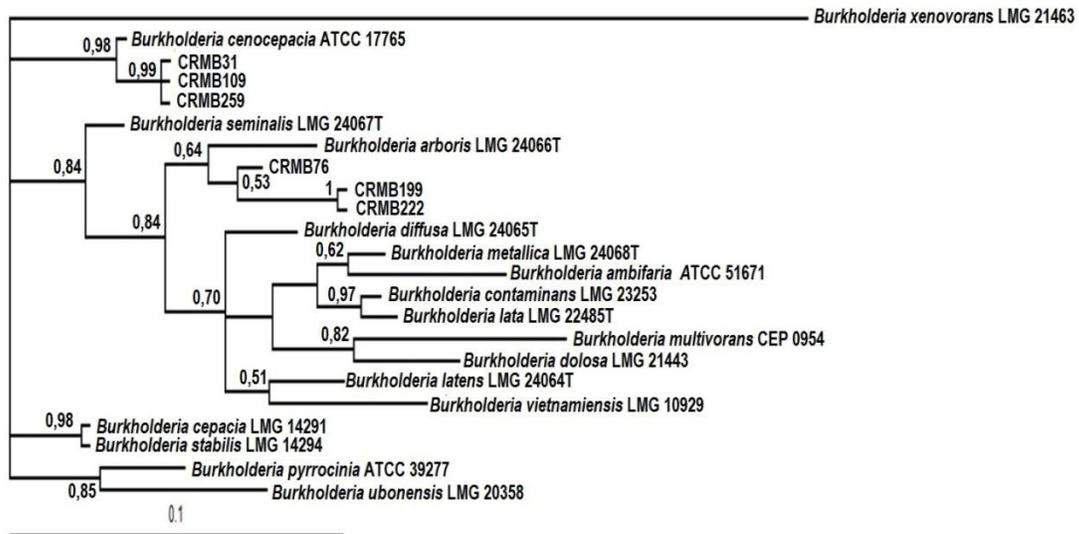
501

502

503

504

505



506 C

507 **Fig. 1.** Árvore filogenética de isolados do complexo *Burkholderia cepacia* construída por meio de
 508 Inferência Bayesiana a partir de sequências parciais do gene *recA*.

509

510

511

512

513

514

515

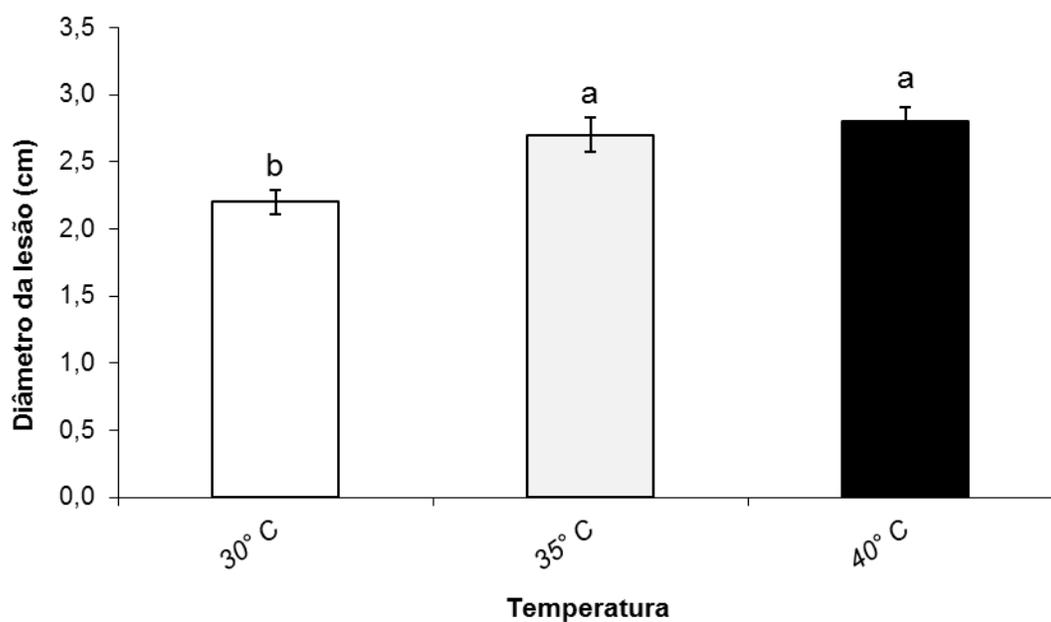
516

517

518

519

520



521 C

522 **Fig. 2.** Influência da temperatura na severidade da podridão em escamas nos catafilos de cebolas
523 causadas por isolados de *Burkholderia cenocepacia* e *Burkholderia arboris*. Média de 10
524 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de
525 DMS ($P \leq 0.05$).

526

527

528

529

530

531

532

533

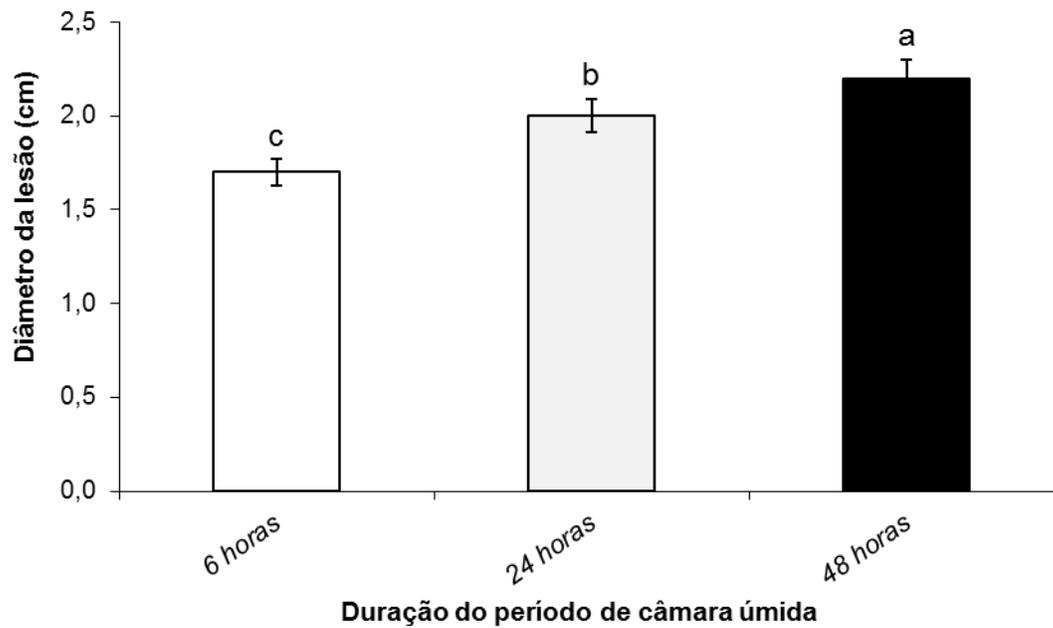
534

535

536

537

538



539

540

541 **Fig. 3.** Influência da amplitude do período de molhamento sobre a severidade da podridão em
542 escamas nos catafilos de cebolas causadas por isolados de *Burkholderia cenocepacia* e
543 *Burkholderia arboris*. Média de 10 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem
544 significativamente entre si pelo teste de DMS ($P \leq 0.05$).

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

Conclusões gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- A temperatura média ideal para cultivo de *B. cenosepacia* foi de 30° C e para *B. arboris* foi de 28°C;
- A severidade da podridão em escamas foi mais alta quando a carga de inóculo dos isolados foi de 10⁸ UFC/mL;
- As temperaturas de 35 e 40°C induziram a severidades mais elevadas da podridão em escama para as duas espécies;
- A presença de câmara úmida foi um fator determinante para o aumento da severidade da doença. A exposição a câmara úmida durante 48 h proporcionou uma maior severidade da doença;
- Catafilos de cebola com 90 e 100 dias de idade foram mais suscetíveis ao desenvolvimento dos sintomas da podridão em escamas da cebola.