



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**PODRIDÃO NEGRA DAS CRUCÍFERAS NO BRASIL:  
ETIOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE MANEJO EM COUVE-  
FLOR.**

**JOSEFA NEIANE GOULART BATISTA**

**Brasília – DF**

**2020**

**Josefa Neiane Goulart Batista**

**PODRIDÃO NEGRA DAS CRUCÍFERAS NO BRASIL: ETIOLOGIA E  
ESTRATÉGIAS DE MANEJO EM COUVE-FLOR.**

Tese apresentada à Universidade de  
Brasília como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em  
Fitopatologia pelo Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia

**Orientador**

Profa. Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira, doutora

**Coorientador**

Dra. Alice Maria Quezado Duval

**BRASÍLIA  
DISTRITO FEDERAL – BRASIL**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Batista, J.N.G.

Podridão negra das crucíferas no Brasil: Etiologia e estratégias de manejo em couve-flor.

Brasília, 2020.

Número de páginas p.: 137

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, variabilidade, resistência, cultivares, agrotóxicos.

I. Universidade de Brasília. PPG/FTI.

II. Título. Podridão negra das crucíferas no Brasil: Etiologia e estratégias de manejo em couve-flor.

*A minha mãe Nelma e ao meu pai Josvaldo, a minha filha Júlia, a minha irmã Josiane e  
minhas sobrinhas Giovanna e Raissa.*

***Dedico***

## **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus por cuidar sempre de mim, me auxiliando e me ajudando na concretização dos meus planos durante minha estadia nesta terra. Além disso, quero expressar meus agradecimentos aos meus pais, Nelma e Josvaldo, por toda dedicação na minha criação, pelo amor que sempre tiveram por mim e por sempre me apoiarem em todos os momentos decisivos da minha vida. Expresso também minha gratidão a minha irmã, Josiane, por estar sempre ao meu lado nos momentos que mais precisei, pelo carinho e cumplicidade sem igual. Expresso também o meu amor pela minha filha, Júlia, o motivo de me manter firme nessa caminhada e de ter conseguido chegar tão longe.

Toda minha gratidão aos meus professores, sem exceções. Desde aqueles dos primórdios de minha educação até os que tive na fase acadêmica de doutorado. Cada um de vocês contribuíram diretamente para a eterna soma de caracteres que hoje fazem de mim, Doutora em Fitopatologia. Jamais irei esquecê-los. Estendo de modo especial esta gratidão as minhas orientadoras, Marisa Ferreira e Alice Quezado, pela compreensão, amizade e paciência durante minha orientação no doutorado. Sem vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui.

Uma tese nunca foi e nunca será construída por única pessoa. Gostaria de expressar minha eterna gratidão a todos os meus amigos do Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (Embrapa Hortaliças) que colaboraram para que minha pesquisa pudesse ser finalizada. Fabiana, Luana, Wagner, Cléia, Elenice, Dorian, Caio, Breno, Alba, Gustavo, Rafaela, Luiz Henrique, Jordana e Cris, muito obrigada a todos vocês pelo companheirismo, amizade e pela preciosa ajuda de cada um!

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) pelo financiamento do projeto nº 0193.001317/2016. Ao Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (Embrapa Hortaliças) pela disponibilização da infraestrutura necessária para a realização deste trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília (PPG-FIT). Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Professora Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira**, e coorientação da **Dra. Alice Maria Quezado Duval** com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF.

**PODRIDÃO NEGRA DAS CRUCÍFERAS NO BRASIL: ETIOLOGIA E  
ESTRATÉGIAS DE MANEJO EM COUVE-FLOR.**

**JOSEFA NEIANE GOULART BATISTA**

TESE APROVADA em 18/12/2020, por:

---

Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes (IF Morrinhos, GO)  
Examinador Externo

---

Dr. Carlos Alberto Lopes (Embrapa Hortaliças)  
Examinador Externo

---

Prof. Dr. Mauricio Rossato (Universidade de Brasília)  
Examinador Interno

---

Profa. Dra. Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira (Universidade de Brasília)  
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2020

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>GENERAL ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo 1.....</b>	<b>17</b>
<b>Revisão Bibliográfica, Justificativa e Objetivos .....</b>	<b>17</b>
<b>A Família Brassicaceae .....</b>	<b>18</b>
A cultura da couve-flor ( <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.).....	19
<b>A Podridão Negra.....</b>	<b>22</b>
Histórico e Distribuição Geográfica.....	22
Etiologia .....	22
Detecção e Diversidade .....	25
Sintomatologia.....	26
Epidemiologia e Controle.....	28
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
Objetivo Geral .....	34
Objetivos específicos.....	34
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>36</b>
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>45</b>
<b>Caracterização molecular e fenotípica de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> causando podridão negra em brássicas no Brasil.....</b>	<b>45</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>46</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>48</b>
<b>1 - Introdução .....</b>	<b>49</b>
<b>2 - Material e métodos.....</b>	<b>52</b>
2.1 - Obtenção de isolados e coleção de trabalho.....	52
2.2 - Testes de patogenicidade.....	53
2.3 - Extração de DNA e identificação dos isolados .....	54
2.4 - Sequenciamento parcial do gene <i>housekeeping rpoD</i> .....	55
2.5 - BOX-PCR e definição de haplótipos .....	56
2.6 - Determinação das raças de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	57
2.7 - Teste de sensibilidade ao cobre e a casugamicina <i>in vitro</i> .....	59

<b>3 - Resultados</b> .....	60
3.1 - Multiplex PCR e teste de patogenicidade .....	60
3.3 - Genotipagem com BOX-PCR.....	68
3.4 - Teste de sensibilidade ao cobre e a casugamicina <i>in vitro</i> .....	73
3.5 - Determinação das raças de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	74
<b>4 - Discussão</b> .....	75
<b>5 - Conclusão</b> .....	80
<b>6 - Referências Bibliográficas</b> .....	81
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>87</b>
<b>Reação de genótipos de couve-flor a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>, agente causal da podridão negra no Distrito Federal</b> .....	<b>87</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>88</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>89</b>
<b>1 - Introdução</b> .....	<b>90</b>
<b>2 - Material e métodos</b> .....	<b>92</b>
2.1 - Localização da área experimental .....	92
2.2 - Instalação e condução dos ensaios de avaliação dos genótipos de couve-flor.....	92
2.3 - Avaliação da estabilidade da resistência de híbridos comerciais de couve-flor para Xcc ....	97
<b>3 - Resultados</b> .....	<b>99</b>
3.1- Ensaio em casa de vegetação .....	99
3.2 - Ensaio em campo .....	99
3.3 - Avaliação da estabilidade da resistência de híbridos comerciais de couve-flor para Xcc ..	101
<b>4 - Discussão</b> .....	<b>103</b>
<b>5 - Conclusão</b> .....	<b>107</b>
<b>6 - Referências Bibliográficas</b> .....	<b>108</b>
<b>Capítulo 4</b> .....	<b>112</b>
<b>Avaliação de programas de integração e produtos de proteção para o controle da podridão negra</b> .....	<b>112</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>113</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>114</b>
<b>1 - Introdução</b> .....	<b>115</b>
<b>2 - Material e métodos</b> .....	<b>117</b>
<b>3 – Resultados</b> .....	<b>125</b>
3.1- Avaliação de produtos de proteção fitossanitária em campo .....	125
3.2 - Avaliação de produtos de proteção fitossanitária em casa de vegetação .....	126



<b>4 - Discussão</b> .....	<b>128</b>
<b>5 - Conclusão</b> .....	<b>131</b>
<b>6 – Referências Bibliográficas</b> .....	<b>132</b>
<b>Conclusões gerais e perspectivas</b> .....	<b>137</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

**Figura 1.** Sintomatologia da podridão negra em brássicas. A. Sintomas foliares de podridão negra em planta de couve-flor. B. Sintomas foliares de podridão negra em plantas de repolho roxo. C. Lesões que progridem das margens da folha, onde se nota o escurecimento nervuras D. Sintoma de podridão negra nas folhas e na inflorescência de couve-flor. E. Sintoma típico em formato “V” em couve-flor no campo..... 28

### Capítulo 2

**Figura 1.** Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *rpoD*, construída por Neighbor-Joining com o coeficiente de Jukes-Cantor. A sequência de *Stenotrophomonas maltophilia* ICMP 170033 foi utilizada como *outgroup*. Bar: 0,02. Número de acesso dos isolados no GenBank está listado nos braços da árvore. Xcc: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*..... 67

**Figura 2.** Dendrograma gerado a partir da comparação dos perfis genômicos obtidos por BOX-PCR de 151 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* agente causal da podridão negra em brássicas e isolados de referência (IBSBF e IAPAR). A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA e o coeficiente de Dice usado para cálculo de similaridade. IBSBF 1167; IBSBF 1590 e IAPAR 11300; IBSBF 1102; IBSBF 1104 e IBSBF 885 são os isolados referências para *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *raphani*, *X. campestris* pv. *armoraciae*, *X. campestris* pv. *aberrans*, respectivamente. Similaridade mínima limítrofe para definição de haplótipos de Xcc (85,86%)..... 72

**Figura 3.** Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a diferentes concentrações de cobre (A) e casugamicina (B). ..... 74

### Capítulo 4

**Figura 1.** (A) Gotas depositadas na folha de couve-flor resultante da pulverização eletrostática, (B) plantas de couve-flor tratadas com azoxistrobina e difenoconazol e inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), (C) planta tratada com *Bacillus subtilis* (pulverização foliar) e inoculada com Xcc, (D) plantas tratadas com *Bacillus subtilis* (pulverização foliar) e inoculadas com Xcc. .... 128

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

**Tabela 1.** Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e cultivares diferenciais (Vicente e Holub 2013)..... 24

**Tabela 2.** Características dos genomas sequenciados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*..... 27

### Capítulo 2

**Tabela 1.** Designação, hospedeiro, origem geográfica, ano de isolamento, patogenicidade aos 7 e 10 dias em couve-flor cv. Verona, e identificação dos haplótipos dos 151 isolados de brássicas com sintomas de podridão negra. .... 62

**Tabela 2.** Características dos isolados sequenciados: identificação, haplótipo, PCR multiplex (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *X. campestris* pv. *raphani*), patogenicidade em brócolis, couve e couve-flor, PCR para goma xantana, reação de hipersensibilidade em fumo ..... 66

**Tabela 3.** Distribuição das raças de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em 79 isolados coletados de diversas brássicas. .... 75

### Capítulo 3

**Tabela 1.** Ensaios conduzidos e cultivares avaliadas. .... 92

**Tabela 2.** Resultado das análises de solo da área experimental - 2019. Brasília, DF, Brasil.. 96

**Tabela 3.** Médias de precipitação, temperatura e umidade obtidas na estação agrometeorológica da Embrapa Hortaliças – 2019. Brasília, DF, Brasil. .... 97

**Tabela 4.** Dados dos isolados utilizados no ensaio de estabilidade da resistência de híbridos comerciais de couve-flor. .... 98

**Tabela 5.** Índices de severidade na folha mais atacada por planta (IS), nos ensaios de cultivares de couve-flor em casa de vegetação, de acordo com escalas de notas, 2018. Brasília, DF, Brasil.. .... 99

**Tabela 6.** Índices de severidade na folha mais atacada por planta (IS), nos ensaios de cultivares de couve-flor em campo, de acordo com escalas de notas, 2019. Brasília, DF, Brasil.. .... 100

**Tabela 7.** Relação entre diâmetros (ratio) (RDIF), número total de folhas (NTFOLHAS), peso da inflorescência (PIF) e produtividade das cultivares e híbridos de couve-flor, 2019. Brasília, DF, Brasil.. .... 101

**Tabela 8.** Comprimento (cm) da lesão foliar (CLesao) por isolado e cultivar nas folhas inoculadas de híbridos de couve-flor em casa de vegetação, 2020. Brasília, DF, Brasil..... 102

**Tabela 9.** Comprimento (cm) da lesão foliar (CLesao) por isolado e método de inoculação, nas folhas inoculadas de híbridos de couve-flor em casa de vegetação, 2020. Brasília, DF, Brasil..... 103

#### **Capítulo 4**

**Tabela 1.** Resultado das análises de solo da área experimental – 2019. Brasília, DF, Brasil 121

**Tabela 2.** Médias de precipitação, temperatura e umidade obtidas na estação agrometeorológica da Embrapa Hortaliças – 2019. Brasília, DF, Brasil ..... 122

**Tabela 3.** Tratamentos utilizados no ensaio de couve-flor, em campo. Brasília, DF, Brasil. 123

**Tabela 4.** Incidência (INC), relação entre diâmetros (ratio) (RDIF), número total de folhas (NTFOLHAS), peso da inflorescência (PIF) e produtividade (PRODUT) nos diferentes programas de tratamentos da podridão negra em couve-flor, 2019. Brasília, DF, Brasil.. .... 126

**Tabela 5.** Comprimento da lesão em centímetros (CLesão), índice de severidade em porcentagem (IS), pontos de infecção na folha (PI) nos diferentes tratamentos para controle da podridão em couve-flor (Cindy), 2020. Brasília, DF, Brasil..... 127

## RESUMO GERAL

BATISTA, Josefa Neiane Goulart. **Podridão negra das crucíferas no Brasil: Etiologia e estratégias de manejo em couve-flor**. 2020. 137p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A couve-flor é uma hortaliça pertencente à família Brassicaceae, tem grande importância econômica e alto valor nutritivo na alimentação humana. Uma das principais doenças que afeta esse grupo de hortaliças é a podridão negra, que tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). Outros patovares de *X. campestris* também podem induzir sintomas em brássicas. Assim, é importante melhor esclarecer a etiologia da doença, além da variabilidade genética e fenotípica do agente causal. A busca por cultivares resistentes tem sido um desafio constante, pois essa é a principal medida de controle para a doença. Mesmo assim, após o início da doença, poucas medidas de controle são eficientes. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivos: i) identificar isolados de *Xanthomonas*, obtidos em lavouras de brássicas no Brasil e no Distrito Federal, em nível de espécie e patovar, e caracterizar sua variabilidade via PCR específica, perfis genômicos por BOX-PCR, sequenciamento do gene *rpoD* e raças presentes; ii) Caracterizar a sensibilidade *in vitro* de isolados de Xcc ao cobre e casugamicina; iii) Avaliar híbridos comerciais de couve-flor em casa de vegetação e no campo quanto à severidade da podridão negra; iv) Avaliar a estabilidade de dois híbridos frente a 10 isolados de Xcc; e v) Avaliar o desempenho de agrotóxicos para o controle da podridão negra no cultivo de couve-flor em casa de vegetação e no campo. Cento e cinquenta isolados de brócolis, couve, couve chinesa, couve-flor, mostarda selvagem, rabanete e repolho e um isolado de uma planta voluntária de tomate foram identificados como Xcc, por PCR com *primers* específicos e sequenciamento parcial do gene *housekeeping rpoD*. De acordo com os resultados dos ensaios *in vitro* de sensibilidade ao cobre e a casugamicina, 143 isolados foram resistentes a 100 µg/ml de casugamicina e cinco a 200 µg/ml de sulfato de cobre. A análise de BOX-PCR detectou 65 haplótipos distintos na coleção. Na identificação das raças de 79 isolados, verificou-se a ocorrência das raças 1, 3, 4, 6 e 9, com predominância da raça 4 (54,43%, n= 43) e da raça 1 (32,91%, n= 26). Avaliou-se as cultivares Cindy, Sarah, Sharon, Verona, EACF 2000, Veridiana, Shiro, Piracicaba de Verão, Vera F1, Vigo F1 e Champagne Snow, e, posteriormente, a estabilidade da reação das cultivares Sarah e Cindy frente a 10 isolados. O híbrido EACF 2000 apresentou

menor severidade em casa de vegetação. A cultivar Piracicaba de Verão apresentou menor severidade em campo. Já as cultivares mais produtivas foram Vera F1 (19,64 t ha<sup>-1</sup>), Verona (17,18 t ha<sup>-1</sup>) e Veridiana (17,15 t ha<sup>-1</sup>). No ensaio de estabilidade, a resistência intermediária de Sarah foi mantida. Avaliou-se os agrotóxicos azoxistrobina e difenoconazol; óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; trifloxistrobina e tebuconazol; oxiclreto de cobre e mancozebe; *Bacillus subtilis* linhagem Y1336 e casugamicina. Em condições de campo nenhum programa de integração teve efeito na severidade da doença. Além disso, observou-se efeitos dos programas de integração nas variáveis peso da inflorescência e produtividade. Em casa de vegetação, o agrotóxico à base de *Bacillus subtilis* reduziu a severidade da podridão negra em couve-flor quando aplicado via foliar. Desse modo, o emprego de variedades menos suscetíveis aliado a aplicações do produto biológico apresenta um potencial de controle da doença a ser validado em condições de campo e lavouras comerciais de couve-flor.

**Palavras-chaves:** controle, proteção fitossanitária, resistência, variabilidade, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

## GENERAL ABSTRACT

BATISTA, Josefa Neiane Goulart. **Black rot of crucifers in Brazil: Etiology and management strategies in cauliflower.**2020. 137p. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) - University of Brasilia, Brasília, DF.

Cauliflower is a vegetable belonging to the family Brassicaceae. It has great economic importance and high nutritional value for human consumption. One of the main diseases that affects this crop is black rot caused by the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). Other pathovars of *X. campestris* can also induce symptoms in brassicas. Therefore, it is important to better clarify the etiology of the disease, in addition to the genetic and phenotypic variability of the causal agent. The search for resistant cultivars has been a constant challenge, as this is the main control measure for this disease. Even so, after the disease onset, few control measures are expected to be effective. In this context, the present work aimed at: i) Identify the causal agent at species and pathovar levels, and characterize the variability of *Xanthomonas* isolates obtained from brassica crops in Brazil and the Federal District via specific PCR, genomic profiles by BOX-PCR, *rpoD* gene sequencing and race identification, ii) Evaluate *in vitro* sensitivity of Xcc isolates to copper and kasugamycin; iii) Evaluate the severity of black rot in commercial cauliflower hybrids under greenhouse and field conditions; iv) Assess the stability of the best hybrids against 10 Xcc isolates; and v) Evaluate the performance of pesticides for the control of black rot in cauliflower under greenhouse and field conditions. One hundred and fifty bacterial isolates from broccoli, kale, Chinese cabbage, cauliflower, wild mustard, radish, and cabbage and one isolate from a voluntary tomato plant, were identified as Xcc through PCR with specific primers and confirmed by the partial sequencing of the housekeeping gene *rpoD*. *In vitro* tests for sensitivity to copper and kasugamycin showed that 143 isolates were resistant to 100 µg/ml of kasugamycin and five to 200 µg/ml of copper sulfate. BOX-PCR analysis detected 65 distinct haplotypes in the collection. The occurrence of races 1, 3, 4, 6 and 9 was observed, with predominance of races 4 (54.43%, n = 43) and race 1 (32.91%, n = 26) in a subset of 79 isolates. Reaction of cultivars Cindy, Sarah, Sharon, Verona, EACF 2000, Veridiana, Shiro, Piracicaba de Verão, Vera F1, Vigo F1, and Champagne Snow was compared. The stability of the reaction of Sarah and Cindy against 10 isolates was evaluated. The EACF 2000 hybrid

showed less severity under greenhouse conditions. On the other hand, cultivars Veridiana and Piracicaba de Verão showed less disease severity in the field. The most productive cultivars were Vera F1 (19.64 t ha<sup>-1</sup>), Verona (17.18 t ha<sup>-1</sup>) and Veridiana (17.15 t ha<sup>-1</sup>). In the stability test, Sarah's intermediate resistance was confirmed. The following agrochemicals were evaluated for control of black rot: azoxystrobin and difenoconazole, *Melaleuca alternifolia* essential oil; trifloxystrobin and tebuconazole; copper oxychloride and mancozebe; *Bacillus subtilis* strain Y1336 and kasugamycin. Under field conditions, no integration program influenced the severity of the disease. In addition, the effects of integration programs on inflorescence weight and yield were observed. In the greenhouse experiment, the pesticide based on *Bacillus subtilis* reduced the severity of black rot in cauliflower by foliar application. In conclusion, high genetic variability was detected among Xcc isolates in Brazil, the reaction of cultivars was not consistent among greenhouse and field trials, but some cultivars showed lower disease severity than others, and one biological pesticide was shown to be promising for black rot control.

**Keywords:** Chemical control, plant protection, resistance, variability, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

---

Advisory Committee: Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira-University of Brasilia (Advisor); Alice Maria Quezado Duval – Embrapa Vegetables (Co-advisor).



# Capítulo 1

---

---

**Revisão Bibliográfica, Justificativa e Objetivos**

## A Família Brassicaceae

A família Brassicaceae (sin. Cruciferae) é composta por cerca de 338 gêneros e 3.709 espécies com ampla distribuição geográfica. Nessa família encontram-se espécies ornamentais e culturas economicamente importantes usadas na alimentação como vegetais, óleos e condimentos, na indústria de biodiesel e bioprodutos e para alimentação animal (Al-Shehbaz 2012).

O gênero *Brassica* é o que fornece a maior diversidade de produtos utilizados pelo homem. A maioria dos vegetais desse gênero pertence a uma única espécie, *Brassica oleracea* L. e são derivados de modificações no sistema foliar ou radicular, sendo que cada variedade tem sua própria história de domesticação (Dixon 2006). As principais olerícolas dessa espécie são: brócolis (*B. oleracea* L. var. *italica* Plenk), couve-flor (*B. oleracea* L. var. *botrytis* L.), couve comum (*B. oleracea* L. var. *acephala* DC) e repolho (*B. oleracea* L. var. *capitata*) (Filgueira 2008).

A produção mundial de brássicas, em 2018, foi de aproximadamente 70 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 2,4 milhões de hectares, sendo a China e a Índia os maiores produtores mundiais (FAOSTAT 2020). A produção de brássicas (repolho, brócolis e couve-flor) no Brasil, no mesmo ano, foi de 602 mil toneladas, em aproximadamente 43 mil hectares (Melo et al. 2019). Os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná são os maiores produtores dessas hortaliças no país (Melo et al. 2019). No Brasil, repolho, couve, brócolis e couve-flor são as mais cultivadas e consumidas [Anuário Brasileiro de Horticultura (ABH) 2019]. Rúcula, rabanete, mostarda, nabo, couve chinesa, e couve de Bruxelas representam uma menor área cultivada (ABH 2019).

A cultura da couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.)

A couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) possui ampla adaptabilidade, sendo cultivada desde as regiões temperadas aos trópicos. Possui 18 cromossomos diploides e somáticos ( $2n = 2x = 18$ ). A cultura cresce melhor entre as latitudes de 11- 60° N, com uma temperatura média variando de 5 – 8°C a 25 – 28°C, podendo tolerar temperaturas de -10°C a 40°C durante alguns dias durante o período de crescimento vegetativo (Singh et al. 2018).

Existem múltiplas hipóteses para a origem das variedades de couve-flor. Para Schulz (1919), as variedades hoje cultivadas são derivadas das formas selvagens mediterrâneas de *B. oleracea*, e tem como *B. cretica* o provável progenitor da couve-flor. Boswell (1949) afirmou que a couve-flor teve origem nas ilhas de Chipre a partir do repolho selvagem, tendo sido disseminada para a Síria, Turquia, Egito, Itália, Espanha e noroeste da Europa. Hyams (1971) considerou que a couve-flor foi selecionada e propagada pela primeira vez na Síria. Estudos moleculares e genéticos mais recentes sugerem que a couve-flor surgiu no sul da Itália a partir de campos de brócolis na Calábria (Smith e King 2000).

O cultivo extensivo de couve-flor ocorreu primeiro na Itália, onde foram desenvolvidos as cultivares originais ou italianas. Essas cultivares foram levadas para a França, Inglaterra, Alemanha e Holanda, onde foram desenvolvidas cultivares locais importantes. Essas cultivares foram desenvolvidas com base na adequação das condições de cultivo, para o cultivo de inverno e cultivo de verão (Singh et al. 2018).

As couves-flores tropicais têm características diferentes dos tipos europeus pois são tolerantes a alta temperatura e umidade (Singh et al. 2018). No Brasil, as cultivares tradicionais de couve-flor foram introduzidas da Europa no século XIX, na região serrana do Rio de Janeiro. Os primeiros estudos de melhoramento de couve-flor no Brasil ocorreram na

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), a partir de 1945, e resultaram na cultivar F<sub>1</sub> Piracicaba Precoce n<sup>o</sup>. 1 (May et al. 2008).

A couve-flor é uma espécie alógama, bianual, indiferente ao fotoperíodo e que exige frio para passar do estágio vegetativo para o reprodutivo. Suas principais características morfológicas são: folhas alongadas com limbo elíptico, raízes concentradas na profundidade de 20 cm, e parte comestível composta por uma inflorescência imatura inserida sobre um caule curto. Esta é formada a partir do conjunto de primórdios florais, sendo transformados, posteriormente, em botões florais de cores branca, creme, amarela, roxa e verde. A flor possui quatro sépalas e quatro pétalas, os estames são em número de seis, as anteras estão receptivas somente ao se aproximar da abertura da flor, e o fruto é uma síliqua com número de sementes variando entre 10 a 30, em condições normais de formação (May et al. 2007; Filgueira 2008).

O ciclo de produção da cultura é dividido em quatro estádios: o primeiro, de 0 a 30 dias, compreende o crescimento inicial após a emergência das plântulas até a emissão de 5 a 7 folhas definitivas; o segundo estágio, de 30 a 60 dias, ocorre a fase de expansão das folhas externas; o terceiro estágio, de 60 a 90 dias, caracteriza-se pela diferenciação e o desenvolvimento dos primórdios florais e das folhas externas. No quarto estágio, de 90 a 120 dias, ocorre o desenvolvimento da inflorescência. O segundo e terceiro estádios de desenvolvimento da couve-flor são de grande importância na produtividade, uma vez que atuam decisivamente sobre o número e tamanho de folhas, que definirão o potencial produtivo da cultura (May et al. 2007).

A temperatura é o fator agroclimático mais limitante para seu desenvolvimento, mas ao longo dos anos por meio do melhoramento genético foram desenvolvidas cultivares adaptadas a temperaturas mais elevadas. As cultivares são classificadas de acordo com a época ideal

para sementeira, sendo de inverno, de meia-estação e de verão. Essa classificação considera a necessidade de frio para a indução floral (May et al. 2007).

A maioria dos programas de melhoramento genético baseia-se na seleção de características superiores e/ou na eliminação de características inferiores. Para couve-flor, as características desejáveis são: ampla adaptabilidade, uniformidade superior, capacidade de tolerar estresses bióticos e abióticos, qualidade superior de produção, alta produtividade, e tolerância ao calor/umidade. A uniformidade de tamanho da inflorescência é requisitada pela indústria de processamento. Uma planta compacta, juntamente com uma cabeça menor, está se tornando uma característica importante, pois acomoda mais plantas por área e cabeças menores para se adequar ao novo perfil consumidor de famílias menores. A cor da inflorescência está sujeita às preferências do consumidor e o objetivo é obter inflorescência de cor branca ou branco-creme ou desenvolver inflorescência colorida (laranja, roxa e verde) com maior conteúdo de antioxidantes, antocianinas e carotenoides. Ausência de defeitos na cabeça (*riceness*, folhas entremeadas na cabeça), além de ser resistente/tolerante às doenças e pragas que atacam a cultura, são outras características desejáveis (Singh et al. 2018).

A cultura da couve-flor está sujeita a doenças causadas por bactérias, fungos, vírus e nematoides, entre as quais se destacam: podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), mancha de alternaria (*Alternaria brassicae*), míldio (*Peronospora parasitica*), oídio (*Erysiphe polygoni*), hérnia-das-crucíferas (*Plasmodiophora brassicae*), *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e *Meloidogyne* spp.. As principais pragas da cultura são: curuquerê-da-couve (*Ascia monuste orseis*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), traça-das-crucíferas (*Plutella maculipennis*), lagarta-mede-palmo (*Trichoplusia ni*), pulgão (*Brevicoryne brassicae*), formigas cortadeiras (quenquéns – *Acromyrmex*; saúvas – *Attas*) (May et al. 2007).

## A Podridão Negra

### Histórico e Distribuição Geográfica

A podridão negra, causada pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc), é a doença mais importante para o cultivo de brássicas no mundo. Foi descrita pela primeira vez por Garman (1894) como uma doença do repolho em Kentucky, EUA. Em Iowa, EUA, Pammel (1895a, b) observou doença similar em couve-nabo e nabo e, ao isolar colônias amarelas em meio de cultura, demonstrou a natureza bacteriana da doença, denominando o agente causal de *Bacillus campestris*. Relatórios de Wisconsin também atribuíram a doença de nabos e repolho à uma bactéria amarela (Russell, 1898; Smith, 1898). Desde então, a doença foi identificada em todos os continentes onde plantas da família Brassicaceae são cultivadas (Vicente e Holub 2013).

### Etiologia

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Xanthomonadales e família Xanthomonadaceae. É uma bactéria bastonetiforme, gram-negativa, móvel por um único flagelo polar, aeróbica e não utiliza asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio. Cresce em meios de cultura de rotina como ágar nutritivo e ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose, em uma ampla faixa de temperatura (5-36°C), sendo a temperatura ideal de aproximadamente 28°C (Mariano et al. 2001). A maioria das estirpes formam colônias amarelas, mucoides e brilhantes. A xantomonadina é responsável pela pigmentação amarela, o exopolissacarídeo goma xantana é responsável pelo aspecto viscoso da colônia, características essas típicas do gênero *Xanthomonas* (Vauterin et al. 1995).

A taxonomia do gênero baseou-se, até o início dos anos 90, nos hospedeiros de origem e nas características fenotípicas (Van den Mooter e Swings 1990). Vauterin et al. (1995) posteriormente reclassificaram o gênero com base em estudos de hibridização DNA-DNA e propriedades nutricionais. Nessa proposta de reclassificação, a espécie *X. campestris* foi restrita a estirpes que causam doença em plantas da família Brassicaceae, classificadas em seis patovares (pv. *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*, *incanae*, *raphani*).

Com base em testes de patogenicidade e análise de sequências *multilocus* (MLSA), foi proposto que apenas três patovares induzem doenças diferentes em *Brassica*: *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal de podridão negra, *X. campestris* pv. *raphani*, agente causal da mancha foliar em Brassicaceae e Solanaceae, tem como sintomas manchas necróticas típicas envoltas por um halo clorótico no limbo das folhas, e *X. campestris* pv. *incanae*, que afeta plantas ornamentais, as plantas infectadas com este patovar apresentam amarelecimento e murchamento das folhas e também pode ocorrer o desenvolvimento de necrose nas hastes (Fargier e Manceau 2007; Fargier et al. 2011; Cruz et al. 2017).

No Brasil, existem poucos estudos sobre a etiologia da podridão negra. Silva (2006) estudou a diversidade de Xcc no Brasil com uma coleção de 26 isolados, e pelo perfil de utilização de substratos via Biolog<sup>TM</sup>, identificou quatro dos isolados como *X. campestris* pv. *raphani* (Xcr), sendo esse o possível primeiro relato de Xcr no Brasil. Melo (2016) estudando a variabilidade genotípica de isolados de Xcc provenientes do estado de Pernambuco, obteve uma coleção de 159 isolados, dentre os quais não identificou outros patovares, além do patovar *campestris*.

Além da classificação em patovares, nove raças fisiológicas foram identificadas em Xcc com base na resposta de diferentes isolados bacterianos em oito linhas diferenciais de *Brassica* (Vicente et al. 2001; Fargier e Manceau 2007; Jensen et al. 2010) (Tabela 1).

Recentemente, duas novas raças (raça 10 e 11) foram identificados em Portugal (Cruz et al. 2017). Essas raças descritas são denominadas “raças-like”, porque a interação observada ainda não foi caracterizada pelo modelo gene-a-gene de Flor (1956). Entre as raças de Xcc, as raças 1, 4 e 6 são as predominantes mundialmente (Vicente et al. 2001; Singh et al. 2016). Por país ou região, as raças já detectadas são: no Reino Unido: raças 1 e 4 (Vicente et al. 2001), em Portugal: raças 4, 6 e 7 (Cruz et al. 2017), no Nepal: raças 1, 4, 5, 6 e 7 (Jensen et al. 2010), noroeste da Espanha: raças 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (Lema et al. 2012), África Oriental: raças 1 e 4 (Mulema et al. 2012), Índia: raças 1 e 4 (Singh et al. 2016) e Itália: raças 1, 4 e 6 (Bella et al. 2019).

**Tabela 1.** Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e cultivares diferenciais (Vicente e Holub 2013)

Cultivar/espécie diferencial	Raça								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Wirosa F<sub>1</sub></b> ( <i>Brassica oleracea</i> )	+	(+)/+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Just Right Hybrid Turnip</b> ( <i>B. rapa</i> )	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>COB60</b> ( <i>B. napus</i> )	+	(+)	+	-	+	+	+	nt	nt
<b>Seven Top Turnip</b> ( <i>B. rapa</i> )	+	-	+, V	-, V	+, V	+	+	-	-
<b>PIC 1</b> ( <i>B. carinata</i> )	-	(+)	-	-	+	+	+	-	-
<b>FBLM2</b> ( <i>B. juncea</i> )	-	+	-	-	(+)	+	-	-	-
<b>Miracle F<sub>1</sub></b> ( <i>B. oleracea</i> )	+	-/(+)	-/(+)	+	-	+	+	-	-
<b>SxD1</b> ( <i>B. oleracea</i> )	+	-/(+)	-	+	-	(+)/+	+	nt	nt

+ interação compatível (suscetibilidade); - reação incompatível (resistência); (+), fracamente patogênico; nt, não testado; V, variável.



## Detecção e Diversidade

Tendo em vista a importância de identificar o agente causal da podridão negra no nível de espécie, patovar ou raça, vários métodos de identificação, clássicos e moleculares têm sido empregados para esse fim. Os métodos clássicos de identificação são: cultivo em meio semisseletivo e seletivo que promovem o crescimento do patógeno alvo e a inibição do crescimento de contaminantes. Os meios semisseletivos NSCAA, BSCAA e SX ágar tem sido recomendados para detecção de Xcc (Randhawa e Schaad 1984; Galli et al. 2001; Tebaldi et al. 2007). Além desses meios, os meios semisseletivos Xan-D (Lee et al. 2009), FS e mCS20ABN (Chang et al. 1991; Koenraad et al. 2005), SMART-Xca (Kawanishi et al. 2011) e SM ágar (Schaad et al. 2001) também têm sido recomendados para detecção desta bactéria. O meio seletivo D5 também é utilizado para detecção e identificação dessa bactéria (Kado et al. 1970).

Outros métodos para a identificação de Xcc são os métodos sorológicos (ELISA) com a utilização de anticorpos monoclonais específicos para Xcc (Alvarez et al. 1994), e a utilização de perfis metabólicos, como por exemplo, o sistema Biolog<sup>TM</sup> que foi desenvolvido para identificar e caracterizar os microrganismos de acordo com seu metabolismo, com base na utilização ou não de diversos substratos (Holmes et al. 1994; Biolog GN2 Microplate<sup>TM</sup> 2001).

Técnicas moleculares baseadas em PCR para detecção do agente causal de podridão negra foram desenvolvidas. Estão disponíveis *primers* específicos para identificação de Xcc (Park et al. 2004; Berg et al. 2005; Zaccardelli et al. 2007; Leu et al. 2010; Singh et al. 2016), como também para Xcr, patógeno causador da mancha foliar em brássicas e solanáceas (Leu et al. 2010; Leu et al. 2019; Rubel et al. 2019) e para as raças 3 (Afrin et al. 2018) e 1, 2 e 4 (Rubel et al. 2017, 2019) .

A avaliação da variabilidade genética de uma bactéria pode facilitar sua detecção e identificação em estudos taxonômicos e epidemiológicos (Singh et al. 2016). Técnicas de *fingerprint* baseadas em elementos repetitivos do genoma bacteriano, como REP, ERIC e BOX (Rademaker et al. 1997; Singh et al. 2016) e MLSA (*multilocus sequencing analysis*) dos genes *housekeeping gyrB* (DNA girase subunidade B), *rpoB* (subunidade  $\beta$  da RNA polimerase), *dnaK* (proteína de choque térmico 70, chaperonina), *hrp* (reação de hipersensibilidade), *atpD* (regulação da ATP sintase  $F_0 - F_1$  da subunidade beta), *efP* (fator de alongação P), *glnA* (glutamina sintase I), e *fyuA* (receptor ton B-dependente), são empregados para identificação e estudos de diversidade em *Xanthomonas* em nível interespecífico, intraespecífico e intrapatovar (Singh et al. 2016; Fargier et al. 2011; Bella et al. 2019). Muitos estudos tiveram como objetivo identificar a diversidade das populações de Xcc no Reino Unido (Vicente et al. 2001), Portugal (Cruz et al. 2017), Nepal (Jensen et al. 2010), noroeste da Espanha (Lema et al. 2012), África Oriental (Mulema et al. 2012), sul de Moçambique (Bila et al. 2013), Índia (Singh et al. 2016) e Itália (Bella et al. 2019). Até o presente, foi realizado o sequenciamento completo ou parcial do genoma de 14 isolados de Xcc e um sumário de suas características é apresentado na Tabela 2.

### Sintomatologia

Os sintomas podem ser observados em qualquer estágio fenológico da planta. É possível observar a formação de lesões amareladas em formato de “V”, com o vértice voltado para a nervura central da folha (Figura 1). O escurecimento vascular é resultante da colonização bacteriana no sistema vascular da planta. Os tecidos podem se tornar necróticos e as folhas caírem prematuramente. As infecções sistêmicas podem retardar o crescimento e causar a morte da planta. A infecção é muitas vezes latente em temperaturas baixas, a bactéria pode

sobreviver no sistema vascular sem produzir sintomas, quando a temperatura aumenta, os sintomas típicos se tornam aparentes (Vicente e Holub 2013).

**Tabela 2.** Características dos genomas sequenciados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Isolado	Hospedeira	País	Ano	Raça	Tamanho do genoma (bp) <sup>2</sup>	% GC <sup>3</sup>	NGCP <sup>4</sup>	Nº de plasmídeos	Referência
ATCC 33913	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	Reino Unido	1957	3	5.076.187	65,00	4.181	-	da Silva et al. (2002)
Xcc 8004	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Reino Unido	1958	9	5.148.708	64,90	4.273	-	Qian et al. (2005)
B100	- <sup>1</sup>	-	-	1	5.079.002	65,00	4.471	-	Vorhölter et al. (2008)
CN14	<i>B. juncea</i> var. <i>foliosa</i>	China	2003	-	4.989.674	65,00	4.733	1	Bolot et al. (2013a)
CN15	<i>B. rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	China	2003	-	5.019.206	65,00	4.800	2	Bolot et al. (2013a)
CN16	<i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	China	2003	-	5.017.785	65,00	4.793	1	Bolot et al. (2013a)
Xca5	-	EUA	-	1	4.990.056	65,20	4.592	2	Bolot et al. (2013b)
CFBP1869	<i>B. oleracea</i>	Costa do Marfim	1976	1	5.008.832	65,20	4.535	1	Bolot et al. (2015)
CFBP5817	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Chile	2001	4	4.965.622	65,20	4.432	1	Bolot et al. (2015)
ICPM4013	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Nova Zelândia	1974	-	4.972.211	64,55	4.428	-	Desai et al. (2015)
CP0111946	-	Taiwan	2012	-	4.994.426	65,10	4.215	-	Liu et al. (2015)
WHRI 3811	<i>B. oleracea</i>	EUA	-	1	5.079.002	65,00	4471	1	Kong et al. (2019)
MAFF 106712	<i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	Japão	-	-	5.002.720	65,2	4.422	1	(Takeuchi e Mitsuhara 2020).
MAFF 302021	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Japão	-	-	5.048.651	65,1	4.421	-	(Takeuchi e Mitsuhara 2020).

<sup>1</sup> Não informado; <sup>2</sup> bp: pares de base; <sup>3</sup> conteúdo de G+C; <sup>4</sup> número de genes codificantes de proteínas.



**Figura 1.** Sintomatologia da podridão negra em brássicas. **A.** Sintomas foliares de podridão negra em planta de couve-flor. **B.** Sintomas foliares de podridão negra em plantas de repolho roxo. **C.** Lesões que progridem das margens da folha, onde se nota o escurecimento nervuras **D.** Sintoma de podridão negra nas folhas e na inflorescência de couve-flor. **E.** Sintoma típico em formato “V” em couve-flor no campo.

### Epidemiologia e Controle

A podridão negra é uma doença transmitida principalmente por sementes, onde *Xcc* pode se alojar tanto interna quanto externamente (Van der Wolf e Van der Zouwen 2010). As bactérias podem se dispersar a curtas distâncias por vento, insetos, aerossóis, água de irrigação, chuva, e equipamentos agrícolas. Na produção de mudas, o sistema de irrigação pode aumentar significativamente a propagação da bactéria e pode levar a um alto nível de inóculo inicial da doença no campo (Vicente e Holub 2013). *Xcc* pode sobreviver no solo. Silva Júnior et al. (2020) avaliaram a capacidade de sobrevivência de *Xcc* em condições de solo e ambientes brasileiros e concluíram que o período mais longo de sobrevivência de *Xcc* associada a restos culturais de couve-flor foi de 255 dias.

A bactéria penetra através de aberturas naturais da folha, principalmente pelos hidatódios, e por ferimentos, multiplica-se intensamente nos espaços intercelulares e atinge o sistema vascular, sendo levada a todos os órgãos da planta. O patógeno se torna sistêmico, escurecendo os tecidos vasculares, daí a origem ao nome da doença “podridão negra” (Maringoni 2005).

A podridão negra é uma doença que causa grandes perdas econômicas nas brássicas, os sintomas típicos da doença, depreciam o produto comercializado e diminuem a produtividade. O controle da doença é preventivo, visando impedir a entrada do patógeno nas áreas de cultivo. A utilização de sementes saudáveis para o controle da doença é imprescindível. Nos EUA, Reino Unido e na Europa, adota-se 0,01% como nível de tolerância de infecção em sementes de brássicas. O tratamento de sementes é altamente recomendado, pela imersão das sementes em água quente, utilização de antibióticos e hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio ou acetato cúprico, mas nenhum tratamento é totalmente eficaz (Maringoni 2005; Vicente e Holub 2013).

O controle também pode ser realizado por meio de práticas de manejo e sanitização, que incluem a rotação de culturas, a remoção de restos culturais, eliminação de plantas daninhas, controle químico e biológico, além do uso de cultivares resistentes (Vicente e Holub 2013). A rotação de culturas com espécies não hospedeiras de Xcc deve ser feita com duração mínima de um ano, devido a capacidade de sobrevivência em restos culturais deste patógeno (Silva Junior et al. 2020).

O emprego de produtos de proteção fitossanitária, principalmente químicos, são muito utilizados nas lavouras olerícolas brasileiras. Os fungicidas e/ou bactericidas incluem uma grande variedade de compostos que agem de forma preventiva, protetora ou curativa contra o patógeno, fonte de inóculo e planta hospedeira (Silva et al. 2019). Para uso em brássicas estão

registrados no Sistema on-line Agrofit do Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA (2020), para o controle de patógenos os seguintes princípios ativos: azoxistrobina, mancozebe, oxiclreto de cobre e mancozebe, extrato de folha da planta *Melaleuca alternifolia*, difenoconazol, ciazofamida, cloridrato de propamocarbe e fluopicolida, tebuconazol e trifloxistrobina, mandipropamida, *Bacillus subtilis* linhagem Y1336, *Bacillus pumilus* linhagem QST 2808, *Bacillus amyloliquefaciens* cepa MBI600 e antibiótico (casugamicina).

Atualmente não há nenhum produto registrado para brássicas com indicação para o alvo *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Alguns produtos, no entanto, registrados para as brássicas para controle de doenças causadas por fungos, por terem ingredientes ativos registrados para outros alvos bacterianos em outras culturas, apresentam potencial de controle da podridão negra e merecem (ou poderiam) ser investigados para esse fim, tais como: azoxistrobina e difenoconazol; óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; trifloxistrobina e tebuconazol; oxiclreto de cobre e mancozebe; *Bacillus subtilis* linhagem Y1336) e casugamicina (Agrofit 2020). O Duravel® (constituente ativo *Bacillus amyloliquefaciens* MBI 600), é o único fungicida/bactericida de origem biológica disponível no mercado brasileiro, registrado em novembro de 2019 (Agrofit 2020) que tem como patógeno-alvo Xcc. Os demais produtos biológicos como: Biobac® (*Bacillus subtilis* linhagem Y1336) e Sonata® (*Bacillus pumilus* linhagem QST 2808) são registrados para uso em brássicas (Agrofit 2020).

Sendo os produtos cúpricos os mais tradicionalmente utilizados para o controle de bacterioses no mundo, já existem também relatos de isolados de Xcc resistentes ao cobre em cultivos de brássicas na América Central, em Trinidad (Lugo et al. 2013). Quando uma determinada estirpe bacteriana desenvolve resistência ao cobre, ela continua a afetar a cultura, mesmo com as aplicações na concentração padrão, diminuindo a produtividade da cultura e

dificultando o seu manejo. A aplicação contínua desses compostos no ambiente que já abriga estirpes resistentes do patógeno, ameaça a viabilidade da cultura e acaba levando ao desenvolvimento e comercialização de produtos alternativos e ao manejo integrado da cultura, aliando resistência genética da hospedeira e produtos químicos parece ser a solução mais viável (Lamichhane et al. 2018).

O desenvolvimento e o uso de cultivares resistentes à podridão negra são importantes ferramentas no controle da doença, mas têm tido sucesso limitado (Taylor et al. 2002). A disponibilidade de um banco de germoplasma com uma alta diversidade genética é o pré-requisito para o sucesso dos programas de melhoramento a longo prazo (Glaszmann et al. 2010). A variabilidade e a herança da resistência à podridão negra foram estudadas em várias espécies de brássicas mas, até o presente, nenhum gene de resistência à doença foi identificado e clonado (Vicente e Holub 2013). A maioria dos estudos se concentrou em acessos de *B. oleracea* (representando o genoma C de brássicas) e um número limitado de fontes de resistência foram identificadas, incluindo genótipos de repolho Early Fuji, e PI 436606 (cv. Heh Yeh da Ping Tou), e couve-flor MGS 2-3, Pusa Kea e SN445 (Sharma et al. 1977; Camargo et al. 1995; Taylor et al. 2002). QTLs (um loci de características quantitativas) para resistência a Xcc foram geneticamente mapeados na linha pura Badger Inbred- 16, que foi derivado de Fuji precoce (Camargo et al. 1995). Jensen et al. (2005) relataram resistência de campo a Xcc nas cultivares híbridas T-689 F1, Gianty F1, No. 9690 F1, N 66 F1 e SWR-02 F1. Em outro estudo, Griffiths e Roe (2005), ao testar diferentes métodos de inoculação, em diferentes estádios de crescimento da planta, identificaram resistência a Xcc em linhagens de Badger Inbred-16, Cornell 101, Cornell 102 e NY 4002. Devido a isso, é amplamente aceito que acessos de *B. oleracea* são mais suscetíveis às diferentes raças de Xcc (Saha et al. 2016).

As fontes mais comuns e potencialmente úteis de resistência à podridão negra ocorrem nos genomas A (*B. rapa*) e B (*B. nigra*) e várias fontes de resistência foram identificadas nas diferentes espécies que contêm esses genomas (Taylor et al. 2002). O genoma de *B. rapa* (genoma A) e nos tetraploides *B. carinata* (genoma do BC) e *B. napus* (genoma da AC) (Vicente et al. 2002; Guo et al. 2019) também são fontes de resistência para programas de melhoramento. Além disso, a maioria dos acessos de *Arabidopsis thaliana* tem resistência a uma ou mais raças de Xcc e mais da metade dos acessos exibem resistência de amplo espectro à todas principais raças do Xcc, indicando que *A. thaliana* poderia ser usado como uma fonte de resistência a Xcc (Holub 2007).

Nova fonte de resistência foi identificada em *B. montana* (acesso UNICT5169) e *B. balearica* (acesso PI435896) que são parentes selvagens de *B. oleracea*. Essas espécies selvagens são intimamente relacionadas, e geralmente, têm os mesmos 18 cromossomos que as culturas do genoma C e apresentam certo grau de compatibilidade sexual com as cultivares de *B. oleracea* (Sheng et al. 2020). Esses acessos selvagens foram resistentes a isolado de Xcc raça 4 (Xcc 4), essa resistência específica não é facilmente encontrada em *B. oleracea*. Após esse estudo inicial, híbridos F1 foram produzidos com sucesso entre o acesso selvagem UNICT5169 e uma linhagem suscetível de couve-flor, indicando potencial de transferência da resistência para couve-flor (Sheng et al. 2020). Os resultados da avaliação da severidade dos sintomas da população F2 indicam que a resistência a Xcc 4 em UNICT5169 é uma característica quantitativa, que orienta a localização futura do gene de resistência e melhoramento da resistência à podridão negra (Sheng et al. 2020).

Apesar desse estudo, até o presente momento um único gene dominante específico foi mapeado no genoma de *B. napus* (Vicente et al. 2002) e QTLs que controlam a resistência a, pelo menos, duas das raças mais prevalentes de Xcc foram mapeadas em um acesso chinês de



*B. rapa* (Soengas et al. 2007). Iglesias-Bernabé et al. (2019) identificaram quatro QTLs de característica única relacionados à resistência à raça 1 de Xcc. Portanto, a resistência é quantitativa e está sob controle poligênico, confirmando resultados encontrados por outros autores (Kifuji et al. 2013; Lee et al. 2015). Provavelmente, três QTLs estão relacionados a outros QTLs de resistência encontradas anteriormente, enquanto o QTL Xcc9.1 representa uma nova variação. Poucos genes qualitativos de resistência contra patógenos bacterianos vasculares foram identificados até o momento. Embora a resistência qualitativa não tenha sido identificada, estudos anteriores mostraram que, em alguns casos, os QTLs podem ser genes de resistência que perderam suas características qualitativas e adotaram novos fenótipos de resistência intermediária (Iglesias-Bernabé et al. 2019).

## JUSTIFICATIVA

---

As dificuldades no controle da podridão negra das brássicas muitas vezes ocorrem devido ao desconhecimento da variabilidade genotípica de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, da prevalência de suas raças, da reação dos genótipos comerciais frente à doença, como é o caso também da couve-flor, e da pouca disponibilidade de produtos de proteção fitossanitária que tenham como alvo esse patógeno. Uma melhor elucidação da etiologia da doença no Brasil, com base em uma coleção mais abrangente de isolados, estudos da variabilidade do patógeno e da reação dos genótipos, bem como, sobre a eficiência de produtos de proteção fitossanitária que estão disponíveis para a cultura das brássicas subsidiariam a adoção de novas tecnologias adequadas para o controle da podridão negra.

## OBJETIVOS

---

### Objetivo Geral

- Elucidar a etiologia, caracterizar a variabilidade do agente causal da podridão negra das crucíferas no Brasil e avaliar estratégias de manejo da doença em couve-flor, de forma a integrar produtos para a proteção de plantas e a resistência genética varietal.

### Objetivos específicos

- Investigar por PCR multiplex a ocorrência dos patovares *campestris* e *raphani* na coleção de isolados de *Xanthomonas* de brássicas coletados no Brasil;

- Caracterizar a variabilidade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* determinando os seus perfis genômicos por BOX-PCR, sequenciamento do gene *rpoD* e as raças existentes;
- Caracterizar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ao cobre e casugamicina;
- Avaliar híbridos comerciais de couve-flor em casa de vegetação e no campo, quanto à severidade da podridão negra;
- Avaliar a estabilidade dos melhores híbridos frente a uma gama de isolados de Xcc;
- Avaliar o desempenho de produtos fitossanitários (oxicloreto de cobre, casugamicina, *Bacillus subtilis* linhagem Y1336, tebuconazol e trifloxistrobina, azoxistrobina, óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*) para o controle da podridão negra no cultivo de couve-flor em casa de vegetação e no campo.

## Referências Bibliográficas

---

- Afrin KS, Rahim MA, Rubel MH, Natarajan S, Song JY, Kim HT, Nou IS (2018) Development of race-specific molecular marker for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 3, the causal agent of black rot of crucifers. *Canadian Journal of Plant Science* 98:1119–1125.
- Agrofit (2020) Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 26 de outubro de 2020.
- Al-Shehbaz IA (2012) A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon* 61:931–954.
- Alvarez A M, Benedict A A, Mizumoto CY, Hunter JE, Gabriel DW (1994) Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology* 84: 1449-1457.
- Anuário Brasileiro de Hortaliças (2019) Kist BB, Santos CE, Carvalho C, Beling RR (Eds). Santa Cruz do Sul, Brasil. Editora Gazeta. p.49.
- Bella P, Moretti C, Licciardello G, Strano CP, Pulvirenti A, Alaimo S, Catara V (2019) Multilocus sequence typing analysis of Italian *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains suggests the evolution of local endemic populations of the pathogen and does not correlate with race distribution. *Plant Pathology* 68:278–287.
- Berg T, Tesoriero L, Hailstones DL (2005) PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. *Plant Pathology* 54:416–427.
- Bila J, Mortensen CN, Andresen M, Vicente JG, Wulff EG (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 1 is the main causal agent of black rot of Brassicas in Southern Mozambique. *African Journal of Biotechnology* 12:602–610.
- Bolot S, Cerutti A, Carrère S, Arlat M, Fischer-Le Saux M, Portier P, Noël LD (2015). Genome sequences of the race 1 and race 4 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

- strains CFBP 1869 and CFBP 5817. *Genome Announcements*, 3(5).
- Bolot S, Guy E, Carrere S, Barbe V, Arlat M, Noël LD (2013) Genome sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strain Xca5. *Genome Announcements* 1.
- Bolot S, Roux B, Carrere S, Jiang BL, Tang JL, Arlat M, Noël LD (2013). Genome sequences of three atypical *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains, CN14, CN15, and CN16. *Genome announcements* 4.
- Boswell VR (1949) Our vegetable travelers. *National geographic* 96: 145-218
- Camargo LEA, Williams PH, Osborn TC (1995) Mapping of quantitative trait loci controlling resistance of brassica oleracea to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the field and greenhouse. *Phytopathology* 95: 1296-1300.
- Chang C J, Donaldson R, Crowley M, Pinnow D (1991) A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology* 81: 449-453.
- Cruz J, Tenreiro R, Cruz L (2017) Assessment of diversity of *Xanthomonas campestris* pathovars affecting cruciferous plants in Portugal and disclosure of two novel *X. campestris* pv. *campestris* races. *Journal of Plant Pathology* 99:403–414.
- Da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Amaral AM (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459–463.
- Da Silva RS, De Oliveira MMG, Silva KP, Rodrigues IDSV, Pinto VDS, Blank AF, Fernandes RPM (2020) Synergistic effect of *Cordia curassavica* Jacq. essential oils association against the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 4376-4389.
- Desai D, Li JH, de Jong EVZ, Braun R, Pitman A, Visnovsky S, Christey M (2015) Draft genome sequences of two New Zealand *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates, ICMP 4013 and ICMP 21080. *Genome announcements*, 3(5).
- Dixon GR (2006) Origins and diversity of Brassica and its relatives. *Vegetable brassicas and*

related crucifers, 1-33.

FAO. FAOSTAT – Agricultural statistics database. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>

Fargier E, Manceau C (2007) Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 56:805–818.

Fargier E, Saux MF Le, Manceau C (2011) A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Systematic and Applied Microbiology* 34:156–165.

Filgueira FAR (2008) Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa. UFV. pp.421.

Flor H H (1956) The complementary genic systems in flax and flax rust. In *Advances in genetics*. Academic Press. Vol: 8. pp. 29-54.

Galli JA, Panizzi RC, Sader R, Camargo M (2001) Efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na germinação de sementes de couve-flor e eficiência de meios de cultura na detecção do patógeno em sementes de repolho. *Revista Brasileira de Sementes* 23: 171-176.

Garman H (1894) A bacterial disease of cabbage. *Kentucky Agricultural. Exp. Station. Reporter*. 3: 43–46.

Glaszmann JC, Kilian B, Upadhyaya HD, Varshney RK (2010) Accessing genetic diversity for crop improvement. *Current Opinion of in Plant Biology* 13:167–173.

Griffiths PD, Roe C (2005) Response of *Brassica oleracea* var. *capitata* to wound and spray inoculations with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *HortScience* 40:47–49.

Guo H, Dickson MH, Hunter JE (2019) *Brassica napus* Sources of Resistance to Black Rot in Crucifers and Inheritance of Resistance. *HortScience* 26:1545–1547.

Holub EB (2007) Natural variation in innate immunity of a pioneer species. *Current Opinion*

of in Plant Biology 10:415–424.

Hyams E (1971) Plants in the service of man. 10,000 years of domestication. London, UK, JM Dent & Sons Ltd.

Iglesias-Bernabé L, Madloo P, Rodríguez VM, Francisco M, Soengas P (2019) Dissecting quantitative resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in leaves of *Brassica oleracea* by QTL analysis. Scientific Reports 9:1–11.

Islam MT, Lee BR, Park SH, Jung WJ, Bae DW, Kim TH (2019) Hormonal regulations in soluble and cell-wall bound phenolic accumulation in two cultivars of *Brassica napus* contrasting susceptibility to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Plant Science 285:132–140.

Jensen BD, Massomo SMS, Swai IS, Hockenhull J, Andersen SB (2005) Field evaluation for resistance to the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage (*Brassica oleracea*). European Journal of Plant Pathology.

Jensen BD, Vicente JG, Roberts SJ, Manandhar HK (2010) Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal. Plant Disease 94:298–305.

Júnior TAFS, Silva JC, Gonçalves RM, Soman JM, Passos JRS, Maringoni AC (2020) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. European Journal of Plant Pathology 156:399–411.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969–76.

Kawanishi T, Shiraishi T, Okano Y, Sugawara K, Hashimoto M, Maejima K, Oshima K (2011) New detection systems of bacteria using highly selective media designed by SMART: selective medium-design algorithm restricted by two constraints. PloS one 6:16512.

Kifuji Y, Hanzawa H, Terasawa Y, Nishio T (2013) QTL analysis of black rot resistance in

- cabbage using newly developed EST-SNP markers. *Euphytica* 190:289–295.
- Koenraad H, Van Bilsen JGPM, Roberts SJ (2005) Comparative test of four semi-selective agar media for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in brassica seeds. *Seed Science and Technology* 33: 115-125.
- Kong C, De Passo VH, Fang Z, Yang L, Zhuang M, Zhang Y, Lv H (2019) Complete genome sequence of strain WHRI 3811 race 1 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the causal agent of black rot of cruciferous vegetables. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32:1571–1573.
- Lamichhane JR, Osdaghi E, Behlau F, Köhl J, Jones JB, Aubertot JN (2018) Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 38:28.
- Lee J, Izzah NK, Jayakodi M, Perumal S, Joh HJ, Lee HJ, Seo J (2015) Genome-wide SNP identification and QTL mapping for black rot resistance in cabbage. *BMC Plant Biology* 15:1–11.
- Lee YA, Sung AN, Liu TF, Lee YS (2009) Combination of chromogenic differential medium and estA-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6831-6838
- Lema M, Cartea ME, Sotelo T, Velasco P, Soengas P (2012) Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by *Brassica* spp. genotypes and rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 133:159–169.
- Leu YS, Deng WL, Yang WS, Wu YF, Cheng AS, Hsu ST, Tzeng KC, Yang WS (2010) Multiplex Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *X. campestris* pv. *raphani*. *Plant Pathology Bulletin* 137–147
- Liu YC, Wang SC, Yu YJ, Fung KM, Yang MT, Tseng YH, Chou SH (2015) Complete Genome Sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strain 17 from Taiwan. *Genome Announcements* 3:2164.
- Lugo AJ, Elibox W, Jones JB, Ramsubhag A (2013) Copper resistance in *Xanthomonas*



- campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. *European Journal of Plant Pathology* 136:61–70.
- Mariano RLR, Silveira B, Assis SMP, Gomes AMA, Oliveira IS, Peixoto AR (2001) Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: Michereff SM, Barros R (Eds) *Desafios da proteção de plantas na agricultura sustentável*. Recife, Brasil. UFRPE. pp. 141-169.
- Maringoni AC (2005) Doenças de crucíferas. In: Kimati, H (Ed.) *Manual de Fitopatologia: Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas*. 4 ed. São Paulo, Brasil. Agronômica Ceres. pp. 285-291.
- May A, Tivelli S, Vargas PF, Sanra AG, Sacconi LV, Pinheiro MQ (2007) A cultura da couve-flor. Campinas: Instituto Agronômico. (Boletim técnico 200).
- Melo EA (2016) Estrutura de população e caracterização filogenética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brasil.
- Melo RA, Vendrame LP, Madeira NR, Blind AD, Vilela NJ (2019) Characterization of the Brazilian vegetable brassicas production chain. *Horticultura Brasileira*, 37: 366-372.
- Mulema JMK, Vicente JG, Pink DAC, Jackson A, Chacha DO, Wasilwa L, Hand P (2012) Characterization of isolates that cause black rot of crucifers in East Africa. *European Journal of Plant Pathology* 133:427–438.
- Nieuwhof M (1969) Cole crops. Botany, cultivation, and utilization. Cole crops. Botany, cultivation, and utilization.
- Pammel LH (1895a) Bacteriosis of rutabaga (*Bacillus campestris* n. sp.). *American. Mon. Microscopy. Journal*. 16: 145–151.
- Pammel LH (1895b) Bacteriosis of rutabaga (*Bacillus campestris* n. sp.). *Iowa State College Agricultural Exp. Station Bulletin* 27, 130–134.
- Park Y J, Lee BM, Ho-Hahn J, Lee GB, Park DS (2004) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species-specific primers based on *hrpF* gene sequences. *Microbiological Research* 159: 419-423.
- Qian W, Jia Y, Ren SX, He YQ, Feng JX, Lu LF, Wu W (2005) Comparative and functional

- genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Research* 15:757–767.
- Rademaker JL (1997) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. *DNA markers: protocols, applications, and overviews*, 151-171
- Randhawa PS, Schaad NW (1984) Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology* 74: 268-272.
- Romeiro RDS (2005) Bactérias fitopatogênicas. Universidade Federal de Viçosa.
- Rubel MH, Natarajan S, Nath UK, Denison MIJ, Hee-Jeong J, Hoy-Taek K, Ill-Sup N (2019) Development of a marker for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races 1 and 2 in *Brassica oleracea*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60: 511-517.
- Rubel MH, Robin AHK, Natarajan S, Vicente JG, Kim HT, Park JI, Nou IS (2017) Whole-genome re-alignment facilitates development of specific molecular markers for races 1 and 4 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the cause of black rot disease in brassica oleracea. *International Journal of Molecular Science* 18:1–15.
- Russell HL (1898) A bacterial rot of cabbage and allied plants. *Wisconsin Agricultural Exp. Station Bulletin* 65, 1–39.
- Saha P, Kalia P, Sharma M, Singh D (2016) New source of black rot disease resistance in *Brassica oleracea* and genetic analysis of resistance. *Euphytica* 207:35–48.
- Schaad NW, Alvarez A (1993) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: cause of black rot of crucifers. *In: Swings, J.G. & Civerolo, E.L., (eds). Xanthomonas*. Chapman & Hall. London. p. 51–55.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Diagnostic media and tests. *Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third edition. p.7.
- Schulz OE (1919) IV. 105 Cruciferae-Brassicaceae. Part 1. Subtribes Brassicinae and Raphaninae. *In: A. Engler, (ed.), Das Pflanzenreich, Heft 68-70, Wilhelm Engelmann, Leipzig*. pp. 1-290.
- Santos Silva C, Araújo RGV, Lima JRB, dos Santos TMC, da Silva Nascimento M, Montaldo Y, da Silva JM (2019) Resistance induction in *Brassica oleracea* var. *acephala* to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and growth promotion by endophytic. *Brazilian Journal of Development* 5:22401–22414.

- Sharma, B. R; Swarup, V. Chatterjee SS (1977) Resistance to blackrot disease (*Xanthomonas campestris* (Pam.) Dowson) in cauliflower. Science Horticulture (Amsterdam) 7.
- Sheng XG, Branca F, Zhao ZQ, Wang JS, Yu HF, Shen YS, Gu HH (2020) Identification of Black Rot Resistance in a Wild Brassica Species and Its Potential Transferability to Cauliflower. Agronomy 10: 1400.
- Silva MR (2006) Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Brasil. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Singh BK, Singh B, Singh PM (2018) Breeding Cauliflower: A Review. International Journal of Vegetable Science 24:58–84.
- Singh D, Rathaur PS, Vicente JG (2016) Characterization, genetic diversity and distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot disease in cruciferous crops of India. Plant Pathology 65:1411–1418.
- Smith EF (1898) The black rot of the cabbage. US Dep. Agricultural Farmer's Bulletin 68, 1–21.
- Smith LB, King GJ (2000) The distribution of BoCAL-a alleles in *Brassicaoleracea* is consistent with a genetic model for curd development and domestication of the cauliflower. Molecular Breeding 6:603–613.
- Soengas P, Hand P, Vicente JG, Pole JM, Pink DAC (2007) Identification of quantitative trait loci for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica rapa*. Theoretical and Applied Genetics 114:637–645.
- Takeuchi K, Mitsuahara I (2020) Complete genome sequences of two strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated in Japan. Microbiology Resource Announcements 9–10.
- Taylor JD, Conway J, Roberts SJ, Astley D, Vicente JG (2002) Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica genomes. Phytopathology 92: 105-111.
- Van den Mooter M, Swings J (1990) Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266

- Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40:348–369.
- Van Der Wolf JM, Van Der Zouwen PS (2010) Colonization of cauliflower blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via flies (*Calliphora vomitoria*) can result in seed infestation. *Journal of Phytopathology*, 158: 726-732.
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:472–489.
- Vicente JG, Conway J, Roberts SJ, Taylor JD (2001) Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and related pathovars. *Phytopathology* 91:492–499.
- Vicente JG, Holub EB (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* 14:2–18.
- Vicente JG, Taylor JD, Sharpe AG, Parkin IAP, Lydiate DJ, King GJ (2002) Inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica genomes. *Phytopathology* 92:1134–1141.
- Vorhölter FJ, Schneiker S, Goesmann A, et al (2008) The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *Journal of Biotechnology* 134:33–45.
- Zaccardelli M, Campanile F, Spasiano A, Merighi M (2007) Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene *hrcC*. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 299-306.

# Capítulo 2

---

---

**Caracterização molecular e fenotípica de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causando podridão negra em brássicas no Brasil**

## Caracterização molecular e fenotípica de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causando podridão negra em brássicas no Brasil

### Resumo

A podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) é uma das doenças mais importantes na produção em brássicas no Brasil. No presente estudo, 150 isolados bacterianos de amostras foliares sintomáticas de brócolis, couve, couve chinesa, couve-flor, mostarda selvagem, rabanete e repolho e um isolado de uma planta voluntária de tomate apresentando lesões foliares, obtido em lavoura de repolho atacada, foram identificados e caracterizados fenotípica e genotipicamente. Desses 151 isolados, 145 isolados foram confirmados como Xcc por PCR multiplex com *primers* específicos para Xcc e *X. campestris* pv *raphani* (Xcr) e foram patogênicos a couve-flor cultivar Verona, inclusive o isolado obtido do tomateiro. A identidade de seis isolados que, embora PCR positivos, não foram patogênicos a couve-flor, foi determinada pelo sequenciamento parcial do gene *housekeeping rpoD*, confirmando serem Xcc. Ensaio *in vitro* de sensibilidade ao cobre e casugamicina indicaram que 143 isolados foram resistentes a 100 µg/ml de casugamicina e 3,45% (n= 5) são resistentes a 200 µg/ml de sulfato de cobre. A análise de BOX-PCR resultou em 65 haplótipos distintos na coleção, sendo o maior número de haplótipos identificado no segmento de brócolis. Na identificação das raças de uma sub-amostra de 79 isolados, utilizando oito cultivares diferenciais, verificou-se a ocorrência das raças 1, 3, 4, 6 e 9 de um total de nove raças, com predominância das raças 4 (54,43%, n= 43) e da raça 1 (32,91%, n= 26). Do conhecimento dos autores este seria o primeiro relato de Xcc associado às plantas de tomate. Esses resultados fornecem ferramentas para programas de melhoramento genético e implantação de programas de manejo integrado da podridão negra nessas importantes hortaliças.

**Palavras-chaves:** *B. oleracea* var. *acephala*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *B. oleracea* var. *capitata*, *B. oleracea* var. *italica*, *Xanthomonas campestris* pv *raphani*.

## Molecular and phenotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot in *Brassica* crops in Brazil

### Abstract

Black rot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) is one of the most important diseases affecting *Brassica oleracea* crops in Brazil. In the present study, 150 bacterial isolates from symptomatic leaf samples from broccoli, kale, Chinese cabbage, cauliflower, wild mustard, radish, and cabbage, and one isolate from a symptomatic tomato plant that grew spontaneously in a diseased cabbage field, were identified, and characterized phenotypically and genotypically. Of these 151 isolates, 145 isolates were confirmed as Xcc by multiplex PCR with specific primers for Xcc and *X. campestris* pv. *raphani* (Xcr) and were pathogenic to cauliflower cultivar Verona, including the isolate obtained from tomato. The identity of six isolates that, although PCR positive for Xcc, were not pathogenic to cauliflower, was determined by partial sequencing of the housekeeping gene *rpoD*, confirming that they were Xcc. *In vitro* copper and casugamycin sensitivity tests indicated that 143 isolates were resistant to 100 µg/mL of casugamycin and 3.45% (n = 5) were resistant to 200 µg/mL of copper sulfate. BOX-PCR analysis detected 65 distinct haplotypes in the collection, with the largest number of haplotypes identified among the broccoli isolates. From a subsample of 79 isolates, inoculated in eight differential genotypes, five races were detected (races 1, 3, 4, 6 and 9) with a predominance of race 4 (54.43%, n = 43) and race 1 (32.91%, n = 26). These results provide tools for genetic improvement programs and the establishment of integrated black rot management programs in these important vegetables. To the best of the authors' knowledge, this is the first report of Xcc associated with tomato plants.

**Keywords:** *B. oleracea* var. *acephala*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *B. oleracea* var. *capitata*, *B. oleracea* var. *italica*, *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*.



## 1 - Introdução

A podridão negra das brássicas, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939 (Xcc), é a principal doença de etiologia bacteriana que ataca diversas espécies e variedades de brássicas. Trata-se de um patógeno sistêmico, transmitido por sementes, o que facilita sua disseminação e introdução em áreas livres da doença (Vicente e Holub 2013). A doença ocorre no Brasil (Silveira, 1949) e está dispersa mundialmente sendo relatada na África (Mulema et al. 2012; Bila et al. 2013), Ásia (Jensen et al. 2010; Singh et al. 2016), Europa (Fargier et al. 2011; Cruz et al. 2017; Bella et al. 2019 e Popovic et al. 2019) e América do Norte (Lange et al. 2016). Os sintomas típicos da doença são lesões amareladas a marrom-escuras em formato de “V” do bordo das folhas a nervura central e o escurecimento dos feixes vasculares resultante da colonização bacteriana dos vasos do xilema. Os tecidos afetados tornam-se necróticos, com as folhas caindo prematuramente; infecções sistêmicas podem levar ao crescimento atrofiado e à morte de plantas jovens (Vicente e Holub 2013). Em alguns casos, pode ocorrer perda total na colheita (Maji e Nath 2015). A umidade relativa do ar alta (80-100%) e temperaturas entre 25-35 °C são favoráveis ao progresso da doença (Griesbach et al. 2003). A utilização de agrotóxicos a base de cobre e de casugamicina podem controlar a doença (Krauthausen et al. 2011), no entanto, a resistência de Xcc ao cobre foi identificada pela primeira vez em 1972, em cultivo de repolho no Japão (Williams et al. 1972). Também houve relatos de resistência ao cobre em Trinidad e Tobago, onde a maioria dos isolados de Xcc foi resistente a altas concentrações de cobre (Lugo et al. 2013). No Brasil, um estudo sobre as reações de isolados de Xcc provenientes de lavouras de produção orgânica verificou que todos os isolados foram resistentes ao sulfato de cobre na concentração de 50 µg/mL e todos foram tolerantes ao produto na concentração de 200 µg/mL. Além do cobre, a maioria dos isolados apresentou alta sensibilidade à tetraciclina, eritromicina e

estreptomicina, mas resistência à amoxicilina, gentamicina, norfloxacin e neomicina (Santos et al. 2008).

Além do patovar *campestris*, outros cinco patovares da espécie *Xanthomonas campestris* infectam a família Brassicaceae: *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *incanae* e *raphani* (Vicente e Holub 2013). *Primers* específicos que permitem diferenciar os patovares *raphani* e *campestris* por PCR estão disponíveis (Berg et al. 2005; Leu et al. 2010; Singh et al. 2014). Com base em testes de patogenicidade e análise de sequência *multilocus* (MLSA) foi proposto que apenas três patovares induzem três doenças diferentes em brássicas: *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal de podridão negra das brássicas, *X. campestris* pv. *raphani*, agente causador da doença denominada mancha foliar em Brassicaceae e Solanaceae, e *X. campestris* pv. *incanae*, agente causador de ferrugem bacteriana em ornamentais (Fargier & Manceau 2007; Fargier et al. 2011). Pela análise filogenética com base em quatro genes (*dnaK*, *fuyA*, *gyrB* e *rpoD*) *X. campestris* formou um grupo monofilético dividido em dois subgrupos: Xcc 1, onde um isolado tipo do patovar *armoraciae* e dois isolados do patovar *aberrans* estão fortemente associados a 21 isolados de Xcc, pertencente ao mesmo ST (*sequence type*), e Xcc 2, com oito isolados de Xcc (Fargier e Manceau 2007; Fargier et al. 2011). Apesar desses estudos, o debate sobre os patovares de Xcc continua, com a classificação mais aceita de seis patovares dentro da espécie *X. campestris* (Vicente e Holub, 2013).

Nove raças foram identificadas em Xcc com base na resposta a diferentes isolados bacterianos em oito genótipos diferenciais de *Brassica* (Vicente et al., 2001; Fargier e Manceau, 2007; Vicente e Holub, 2013). Um modelo simples gene a gene baseado na interação de pelo menos cinco genes de avirulência e os genes R correspondentes foi usado para explicar a relação entre as raças Xcc e as diferenciais de *Brassica*. O modelo proposto é

hipotético, visto que esses dados moleculares ainda não foram validados. (Vicente et al. 2001; Fargier e Manceau 2007; Vicente e Holub 2013). As raças 1 e 4, que foram descritas em vários países, são as raças mais comuns (Vicente et al. 2001; Jensen et al. 2010; Lema et al. 2012; Mulema et al. 2012; Vicente e Holub 2013; Singh et al. 2016). Duas possíveis novas raças, 10 e 11, foram descritas por Cruz et al. (2017), que merecem mais análise. Além da reação nas diferenciais, para identificação das raças pode-se usar PCR para as raças 1, 2 e 4 (Rubel et al. 2017, 2019) e para raça 3 de Xcc (Afrin et al. 2018).

O conhecimento da variabilidade de um patógeno é importante para a seleção e identificação de fontes de resistência, desenvolvimento de programas de melhoramento, e para o estabelecimento de estratégias eficazes para controlar a podridão negra. Muitos esforços visaram identificar variabilidade nas populações de Xcc, a saber, no Reino Unido (Vicente et al. 2001), Portugal (Vicente 2004; Cruz et al. 2017), Israel (Valverde et al. 2007), Nepal (Jensen et al. 2010), noroeste da Espanha (Lema et al. 2012), África Oriental (Mulema et al. 2012), sul de Moçambique (Bila et al. 2013), Índia (Rathaur et al. 2015; Singh et al. 2016), Estados Unidos (Lange et al. 2016); Sérvia (Popovic et al. 2019) e Itália (Bella et al. 2019). Para isso, vários métodos são utilizados, como: análises de *fingerprints* como rep-PCR e análise de sequência *multilocus* (MLSA) baseada nas sequências de genes *housekeeping*.

No Brasil, o cultivo de brássicas, notadamente brócolis, couve, couve-flor e repolho, concentra-se, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, tem grande importância econômica, com grandes volumes de produção e rápido retorno monetário para pequenos e grandes produtores (Melo et al. 2017). Esse setor também possui um grande impacto, gerando direta e indiretamente empregos, do plantio à industrialização, seja pela produção de produtos frescos minimamente processados/ higienizados ou produtos congelados (Melo et al. 2017). A podridão negra ocorre comumente nos cultivos de brássicas (Santos et al. 2008). Em

condições climáticas favoráveis, temperatura elevada e alta umidade do ar, tem-se alta prevalência da doença nas áreas cultivadas. Por exemplo, em campos de couve-flor, a incidência pode ser superior a 80% (Peruch et al. 2006).

Os estudos sobre a etiologia da podridão negra e variabilidade de Xcc no Brasil são escassos. Devido à importância do cultivo de brássicas no Brasil e à alta incidência da podridão negra, a falta de informações atualizadas sobre seu agente causal e, possivelmente, a ocorrência de outros patovares de *X. campestris*, foi realizado um estudo com uma ampla coleção de isolados brasileiros dos últimos anos com o objetivo de verificar a variabilidade de Xcc, prospectar a presença de outros patovares e verificar a potencial utilidade do cobre e da casugamicina que são ingredientes ativos rotulados para uso em *Brassica* spp. no país.

## **2 - Material e métodos**

### **2.1 - Obtenção de isolados e coleção de trabalho**

Amostras de folhas de oito culturas de brássicas (couve-flor, couve, repolho, repolho roxo, brócolis, couve chinesa, rabanete, e mostarda selvagem) apresentando lesões cloróticas em V e lesões necróticas no limbo, foram coletadas em nove estados brasileiros (Ceará, Goiás, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) e no Distrito Federal, durante os anos de 2014 a 2020, obtendo-se 150 isolados (Tabela 1). Um isolado obtido de planta voluntária (tiguera) de tomate crescendo em uma lavoura de repolho em Cristalina, GO, com duas cultivares, sendo uma ocupando quase a totalidade da área e a outra apenas uma faixa, e apresentando lesões necróticas, foi também incluído no estudo, totalizando 151 isolados. Os isolados pertencem à coleção de trabalho do Laboratório de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças), localizado em Brasília, DF. O isolamento das bactérias foi feito em meio Ágar Nutriente-AN

(Schaad et al. 2001). Após 3 a 4 dias de incubação, a 27°C, colônias amarelas típicas do gênero *Xanthomonas* foram observadas e transferidas para novas placas do mesmo meio. Após dois dias de incubação, procedeu-se a preservação dos isolados em tubos de capacidade de 5 ml contendo tampão fosfato (8,5 mmol l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>) que foram mantidos a temperatura ambiente. Os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* IBSBF 1167 (Instituto Biológico de Campinas, São Paulo, Brasil); *X. campestris* pv. *raphani* IBSBF 1590 (=XV16, Estados Unidos e IAPAR 11300); *X. campestris* pv. *armoraciae* IBSBF 1102 (Tanzânia); *X. campestris* pv. *aberrans* IBSBF 1104 (Alemanha); e IBSBF 885 (Austrália) foram utilizados como referência para os diferentes patovares e controles nos testes moleculares.

## 2.2 - Testes de patogenicidade

A patogenicidade dos isolados foi testada em plantas de couve-flor, híbrido comercial Verona (Semini Vegetable Seeds Inc.), após 30 dias do semeio. As suspensões bacterianas foram ajustadas para concentração de 5 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, utilizando-se espectrofotômetro (UV-2000A Instrutherm) (OD<sub>600nm</sub> = 0,3) e as plantas foram inoculadas em quatro pontos por folha, por meio de cortes feitos no sentido transversal às suas bordas nas folhas mais jovens utilizando-se uma tesoura previamente embebida na suspensão bacteriana. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas. Os sintomas foram observados aos 7 e 10 dias após a inoculação. Seções das folhas sintomáticas abrangendo tecidos saudáveis adjacentes a tecidos cloróticos e/ou necróticos foram retiradas de onde procedeu-se o reisolamento do patógeno para confirmação da patogenicidade. Em sequência, os isolados foram preservados em tampão fosfato e mantidos à temperatura ambiente. Alguns isolados não induziram sintomas em couve-flor, então foram realizados testes de hipersensibilidade em fumo, uma suspensão bacteriana de cada isolado com a concentração aproximadamente de 5 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> foi infiltrada com auxílio de uma seringa estéril em folhas de fumo, os sintomas foram

observados após 24 horas da infiltração. Por fim, esses isolados foram inoculados em plantas de brócolis (BRO 68, Syngenta Proteção e Cultivo), couve (Butter Green, Bejo Sementes do Brasil) que foram conduzidos nas mesmas condições já citadas para couve-flor, para se confirmar a patogenicidade desses isolados.

Um ensaio foi também realizado para se confirmar a patogenicidade do isolado da planta voluntária de tomate. Plantas de tomate (Bonny Best), couve-flor (Cindy, Sakata Seeds Sudamerica), brócolis (BRO 68, Syngenta Proteção e Cultivo) e couve (Butter Green, Bejo Sementes do Brasil) foram cultivadas nas condições já mencionadas, uma suspensão bacteriana dos isolados B-2020-166, B-2020-159, B-2020-160, B-2020-161, B-2020-162, B-2020-163, B-2020-164, B-2020-165, o isolado B-2015-51 como controle positivo para Xcc, além do isolado EH 2017-50 de *X. perforans*, com a concentração de aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> foi pulverizada com auxílio de um pulverizador multispray de 500 mL (Guarany®), as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas e os sintomas foram observados após 7 dias da inoculação.

### 2.3 - Extração de DNA e identificação dos isolados

A extração do DNA dos isolados foi feita segundo o protocolo de Mahuku (2004) e 5 µl do DNA resultante foi semiquantificado visualmente em gel, comparados com o marcador High Mass DNA Ladder (Invitrogen, Brasil), os géis foram corados com GelRed (Uniscience, Brasil). As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese (80 V) em gel de agarose a 1% por 2 horas. Em seguida, o gel foi visualizado através de fotodocumentador (L-PIX EX. Locus, Brasil), e o DNA armazenado a -20°C. Para identificação dos isolados, foram utilizados os *primers* específicos para Xcc e Xcr (Leu et al. 2010) no formato multiplex. Os *primers* foram Xcc 2f (5'-TGGGTTTTTCGCCTATCAAAC-3') / 2r (5'-TGCAACTATTTCCTAGCACCG-3') que amplificam um fragmento de DNA de 200 pb; e

Xcr14f (5'-CGTTAGCCAGGTAGAAAGCG-3') / 14r (5'-TCGCTATTTCCATCTACCCG-3') que amplificam um fragmento de 277 pb. As amostras foram amplificadas em um termociclador modelo T100™ (Bio-Rad) com o seguinte programa: um ciclo de 95°C por 5 min para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão. Por fim, um ciclo de 72°C por 10 minutos para extensão final. As reações continham 1X de 10X PCR Buffer (Invitrogen, Brasil), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de cada dNTP, 0,25 μM de cada *primer*, 100 ng de DNA, 0,8 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e água Mili-Q autoclavada para um volume final de 12 μL. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1,5%) após eletroforese em tampão TBE 0,5 X (5,4 g de Tris; 2,75 g de ácido bórico e 0,375 g de EDTA para um volume final de 1 L) conduzido a 100 V por 2 horas, e registrado em fotodocumentador (L-PIX EX, Locus, Brasil). O marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Brasil) foi utilizado para estimar o tamanho dos *amplicons*. Para cada isolado, cada reação foi repetida pelo menos três vezes.

#### 2.4 - Sequenciamento parcial do gene *housekeeping rpoD*

A análise das sequências do gene *rpoD* foi realizada para 11 isolados, sendo seis isolados que não foram patogênicos a nenhuma brássica testada, mas induziram reação de hipersensibilidade em fumo (B-2014-10; B-2015-20, B-2015-48, B-2015-66, B-2015-69 e B-2018-128), quatro isolados do haplótipo predominante de cada segmento (repolho, couve-flor, brócolis e couve) e um isolado de tiguera de tomate. O gene *housekeeping rpoD* (RNA polimerase sigma-70) (Fargier et al., 2011), foi amplificado com os *primers*: rpo11F (5'-ATGGCCAACGAACGTCCTGC-3') / rpo13R (5'-AACTTGTAACCGCGACGGTATTCG-3'). Todas as amplificações foram realizadas em um volume final de 50 μL contendo 1X PCR Buffer (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 400 nM de cada

primer, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 50 ng de DNA. As reações foram realizadas em 35 ciclos, com desnaturação inicial de 3 min a 94°C, cada ciclo consistindo em 50 s a 94°C para desnaturação, para anelamento 50 s a 63°C, 1 min a 72°C para extensão; e extensão final de 7 min a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1%) após eletroforese em tampão TBE 0,5 X (5,4 g de Tris; 2,75 g de ácido bórico e 0,375 g de EDTA para um volume final de 1 L) conduzido a 100 V por 2 horas, e registrado em fotodocumentador (L-PIX EX, Loccus, Brasil). O marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Brasil) foi utilizado para estimar o tamanho dos *amplicons*. A purificação dos produtos de PCR e o sequenciamento foram realizados pela Macrogen (Seul, Coréia do Sul). As sequências obtidas foram analisadas no programa computacional Geneious Prime 2020 (Biomatters Ltd., Auckland, Nova Zelândia), o alinhamento foi realizado com a ferramenta ClustalW. A árvore filogenética foi gerada para comparação entre os isolados escolhidos e sequências de três isolados de referência de Xcc (EU499067, MN872660, MN872663) um de cada patovar, *raphani* (EU499101) e *incanae* (EU499096) obtidas no GenBank. Foi utilizado o método Neighbour-Joining (NJ), com o algoritmo Jukes-Cantor e *bootstrap* de 1000 repetições para todas as sequências. Os resultados foram visualizados no mesmo programa computacional.

## 2.5 - BOX-PCR e definição de haplótipos

Para as reações de BOX-PCR utilizou-se o primer BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3') (Louws et al. 1994) e os seguintes componentes: 1X de buffer (Invitrogen, Brasil), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 2 μM do primer, 50 ng de DNA, 0,105 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e água Mili-Q autoclavada para um volume final de 12 μL. Os fragmentos de DNA foram amplificados no termociclador modelo T100<sup>TM</sup> (Bio-Rad) nas seguintes condições, desnaturação inicial de



95°C por 7 min; seguido por 30 ciclos: 94°C por 1 min para desnaturação, 53°C por 1 min para anelamento e 65°C por 8 min para extensão, e extensão final a 65 °C por 15 min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1,2%) em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 100V durante 3 horas, com o marcador 1 kb DNA Ladder (Promega, EUA) no primeiro e último poço de cada gel. Para cada isolado, a reação foi realizada três vezes. Assim, comparou-se os perfis genômicos de um mesmo isolado por meio do programa GelCompar II versão 6.6 (Applied Maths, EUA). Os géis foram normalizados usando como referência a massa molecular do marcador, as bandas com mais de 1500 pb e com menos 250 pb foram desconsideradas para análise. Observando-se a similaridade existente entre os três perfis genômicos de um mesmo isolado, definiu-se um valor mínimo de similaridade que poderia ser utilizado como limiar para definição de haplótipos, uma vez que as variações dos valores de similaridade de um mesmo isolado poderiam representar os possíveis erros inerentes à própria técnica e ao programa utilizado para a análise dos géis. A partir desses valores, foram realizadas análises de frequências independentes, segundo a regra de Sturges, com intuito de identificar valores de similaridade onde a maioria (mais que 50%) dos isolados se agrupavam. Para fins de comparativos, os perfis genômicos dos isolados de referência foram incluídos na análise. Perfis foram comparados pela análise binária utilizando-se o coeficiente Dice e o método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages).

## 2.6 - Determinação das raças de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

A identificação das raças foi realizada com uma subamostra de 79 isolados representando os diferentes haplótipos, em seguida, a origem geográfica de forma abranger os diferentes estados brasileiros que compõem a coleção, por último foram escolhidas duas áreas de cultivo de brássicas para melhor entendimento, se há várias raças dentro de um mesmo

campo de cultivo. De uma da área, localizada em Planaltina, DF, foram utilizados 21 isolados de dois campos adjacentes de couve-flor (3) e repolho (18). Outros nove isolados originaram-se de um campo com duas cultivares de repolho, uma em maior área e a outra apenas uma pequena faixa, sob o mesmo sistema de irrigação por pivô central, localizados em Cristalina, GO.

O ensaio foi realizado em casa de vegetação sob temperatura variando de 14°C a 27°C. Foram empregados oito genótipos diferenciais de *Brassica* spp. de acordo com Vicente et al. (2001) e Jensen et al. (2010): três genótipos de *B. oleracea*, Wirosa F1 (*B. oleracea* var. *sabauda*), Miracle F1 (*B. oleracea* var. *botrytis*) e SxDI (*B. oleracea*); dois genótipos de *B. rapa*, Just Right Turnip (*B. rapa* var. *rapifera*) e Seven Top Turnip (*B. rapa* var. *rapifera*); um genótipo de *B. juncea*, Florida Broad Leaf Mustard (*B. juncea*); um genótipo *B. napus*, COB60 (*B. napus* var. *oleifera*) e um genótipo de *B. carinata*, PIC (*B. carinata*) as sementes desses genótipos vieram de Warwick, Reino Unido e foram gentilmente cedidas pela dra. Joana G. Vicente (Universidade de Warwick). Além dessas diferenciais, utilizou-se as cultivares híbridas Cindy (couve-flor, Sakata Seeds Sudamerica) e Butter Green (couve, Bejo Sementes do Brasil) como genótipos suscetíveis, em substituição a Wirosa F1 que não germinaram no primeiro ensaio. Os genótipos foram semeados em bandejas de poliestireno de 128 células, contendo substrato comercial com uma semente por célula. Após 30 dias, essas plantas foram transferidas para vasos de um litro contendo uma mistura de solo autoclavado e substrato comercial (9 kg de substrato, 10 kg de solo e 150 g de Osmocote®, fertilizante de liberação lenta). Para cada combinação isolado/genótipo foram realizadas duas repetições sendo cada uma constituída de uma folha inoculada em dez pontos. A inoculação foi realizada por perfuração nas bordas das folhas, entre as nervuras, utilizando uma pinça dentada (“mouse tooth”) envolta com um chumaço de algodão embebido em suspensão bacteriana (aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/mL,  $A_{600nm} = 0,3$ ) (Vicente et al. 2001), as plantas

foram mantidas em câmara úmida por 48 horas. Os sintomas foram avaliados em 7 a 14 dias, sendo considerada reação incompatível, a ausência total de sintomas e compatível, o desenvolvimento de lesões cloróticas ao redor dos pontos de inoculação, seguido de necrose em “V” e escurecimento dos vasos.

## 2.7 - Teste de sensibilidade ao cobre e a casugamicina *in vitro*

Para a realização dos testes de sensibilidade ao cobre e à casugamicina, foram utilizados os produtos sulfato de cobre (Vetec,  $\text{CuSO}_4$  II P.A. anidro,  $159,1 \text{ g mol}^{-1}$ , 97%) e cloridrato de casugamicina (Sigma-Aldrich,  $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_9 \text{ HCl}$ ,  $415,82 \text{ g mol}^{-1}$ , 98,7%). Foi preparada uma solução estoque na concentração de  $200.000 \text{ } \mu\text{g/mL}$  de sulfato de cobre. A seguir, foram adicionadas assepticamente diferentes quantidades da solução estoque ao meio *Medium Minimal Complexing Copper* (MMCC) (Pohronezny et al. 1992) fundente, antes de vertê-lo em placas de Petri, para as concentrações finais de 20, 50, 100, 150 e  $200 \text{ } \mu\text{g/mL}$ . Os isolados mantidos em tampão fosfato foram transferidos para meio NA e incubados por 72 h a  $28^\circ\text{C}$ . Colônias puras foram transferidas para o meio MMCC contendo uma concentração de  $20 \text{ } \mu\text{g/mL}$  para uma prévia sensibilização dos isolados ao cobre e incubadas por 48 h a  $27^\circ\text{C}$ , auxiliando na identificação da concentração máxima que um isolado possa resistir (Ucci 2009). Após esse período, uma alça cheia da massa bacteriana foi transferida para tubos Falcon (capacidade de 15 mL) contendo 10 mL de tampão fosfato autoclavado para o preparo das suspensões. Alíquotas de  $5 \text{ } \mu\text{L}$  dessas suspensões foram depositadas em triplicatas em meio MMCC, contendo cobre na seguinte concentração  $50 \text{ } \mu\text{g/mL}$ . Após a inoculação, as placas foram incubadas a  $28^\circ\text{C}$  por 96 h. As avaliações foram realizadas considerando presença ou ausência de crescimento bacteriano nas três repetições. Como controle foi feita a inoculação em placas de meio MMCC sem adição de cobre. Para os testes com maiores concentrações (100, 150 e  $200 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ) foram preparadas suspensões, com tampão fosfato

autoclavado, na concentração de  $5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, as suspensões foram diluídas em série até a concentração final de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. Alíquotas de 50 µL das suspensões bacterianas foram depositadas e espalhadas, com uma alça de Drigalski, sobre o meio MMCC, contendo cobre nas concentrações de 100, 150 e 200 µg/mL. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 28°C por 72 h e avaliadas pela ausência/presença de crescimento de colônias.

Para o teste *in vitro* de casugamicina, uma solução estoque foi preparada na concentração de 5000 µg/mL. O meio NA foi preparado, e diferentes quantidades da solução estoque foram adicionadas ao meio antes de vertê-lo em placas de Petri, para as concentrações finais de 50 e 100 µg/mL. Os isolados mantidos em tampão fosfato foram transferidos para meio NA e incubados por 72 h a 28°C. Após esse período, uma alça cheia de massa bacteriana foi transferida para tubos Falcon (capacidade de 15 mL) contendo 10 mL de tampão fosfato autoclavado para o preparo das suspensões. Alíquotas de 5 µL dessas suspensões foram depositadas em triplicatas em meio NA, contendo casugamicina nas seguintes concentrações 50 e 100 µg/mL. As placas foram incubadas a 28°C por 96 horas e avaliadas quanto a ausência ou presença de crescimento bacteriano.

### **3 - Resultados**

#### 3.1 - Multiplex PCR e teste de patogenicidade

A identidade de 145 isolados foi confirmada por PCR multiplex utilizando os *primers* para Xcc e Xcr, que permitiu amplificação de um fragmento específico apenas para Xcc de aproximadamente 200 bp. Desses 145 isolados, 42 eram de brócolis (*B. oleracea* var. *italica* Plenck), 38 de repolho (*B. oleracea* var. *capitata* L.), 32 de couve (*B. oleracea* var. *acephala* D.C.), 26 de couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis* L.), dois de couve-chinesa (*B. pekinensis*

Lou.), dois de rabanete (*Raphanus sativus* L.), dois de mostarda selvagem [*B. juncea* (L) Coss.] e um de planta voluntária de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Todos os 145 isolados induziram sintomas típicos de podridão negra em plantas de couve-flor no primeiro teste de patogenicidade, como necrose em “V” do ponto inoculado circundado por clorose e escurecimento das nervuras. No entanto, observou-se variação na agressividade dos isolados. Enquanto a maioria, 120 isolados, induziu sintomas típicos em 7 dias, 25 isolados só induziram sintomas visíveis após 10 dias (Tabela 1). Seis isolados não tiveram sua identidade confirmada porque não foram patogênicos em couve-flor cv. Verona nem em nenhuma das plantas testadas posteriormente (couve, couve-flor Cindy e brócolis) No entanto, todos os isolados induziram uma reação de hipersensibilidade no fumo. Esses isolados foram submetidos ao sequenciamento do gene *rpoD* para estabelecer suas identidades (Tabela 2). No teste de patogenicidade de Xcc em tomateiro, o isolado B-2020-166 (de tomate) induziu sintomas de clorose e pequenas lesões necróticas. Em todas as brássicas testadas observou-se clorose em forma de V com nervuras enegrecidas ao longo da margem das folhas. O isolado B-2015-51 (de brócolis) também induziu a mesma reação que o isolado B-2020-166. O isolado EH 2017-50 de *X. perforans* não foi patogênico a nenhuma brássica testada, induzindo sintomas apenas em plantas de tomate.

**Tabela 1.** Designação, hospedeiro, origem geográfica, ano de isolamento, patogenicidade aos 7 e 10 dias em couve-flor cv. Verona, e identificação dos haplótipos dos 151 isolados de brássicas com sintomas de podridão negra.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Ano	Patogenicidade 7 dias	Patogenicidade 10 dias	Haplótipos BOX-PCR
B 2015 21	Brócolis	Antônio Carlos SC	2015	+	-	H23
B 2015 24	Brócolis	Angelina SC	2015	+	-	H25
B 2015 25	Brócolis	Angelina SC	2015	+	-	H61
B 2015 35	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	-	+	H31
B 2015 36	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H23
B 2015 37	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	-	+	H23
B 2015 38	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	-	+	H24
B 2015 48	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	-	-	H31
B 2015 49	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H57
B 2015 50	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H2
B 2015 51	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H32
B 2015 52	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H25
B 2015 53	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H30
B 2015 55	Brócolis	Munhoz MG	2015	+	-	H8
B 2015 59	Brócolis	Piracicaba SP	2015	+	-	H26
B 2015 62	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H4
B 2015 63	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H49
B 2015 68	Brócolis	Munhoz MG	2015	+	-	H10
B 2015 70	Brócolis	Munhoz MG	2015	+	-	H6
B 2016 74	Brócolis	Rio Grande do Sul	2016	+	-	H30
B 2016 75	Brócolis	Rio Grande do Sul	2016	+	-	H30
B 2016 76	Brócolis	Rio Grande do Sul	2016	+	-	H11
B 2016 77	Brócolis	Gama DF	2016	-	+	H11
B 2016 78	Brócolis	Andradas MG	2016	-	+	H11
B 2016 79	Brócolis	Andradas MG	2016	+	-	H21
B 2016 80	Brócolis	Andradas MG	2016	-	+	H11
B 2016 81	Brócolis	Andradas MG	2016	-	+	H30
B 2017 87	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2017	+	-	H23
B 2017 90	Brócolis	N. R. Vereda DF	2017	+	-	H30
B 2017 91	Brócolis	N. R. Vereda DF	2017	+	-	H38
B 2018 98	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2018	+	-	H28
B 2018 100	Brócolis	N. R. Vargem Bonita DF	2018	+	-	H28
B 2018 106	Brócolis	N. R. Cana Estrutural DF	2018	+	-	H17
B 2018 107	Brócolis	N. R. Cana Estrutural DF	2018	+	-	H17
B 2018 113	Brócolis	N. R. Capão da onça Brazlândia DF	2018	+	-	H19
B 2018 114	Brócolis	Brazlândia DF	2018	+	-	H18
B 2018 116	Brócolis	Brazlândia DF	2018	+	-	H59

B 2018 117	Brócolis	Brazlândia DF	2018	+	-	H59
B 2018 118	Brócolis	Padre Bernardo GO	2018	-	+	H60
B 2018 119	Brócolis	Padre Bernardo GO	2018	+	-	H59
B 2018 120	Brócolis	Padre Bernardo GO	2018	+	-	H60
B 2018 121	Brócolis	Padre Bernardo GO	2018	+	-	H60
B 2018 122	Brócolis	Padre Bernardo GO	2018	+	-	H52
B 2014 10	Couve	Ananindeua PA	2014	-	-	H29
B 2014 12	Couve	Altamira PA	2014	+	-	H8
B 2014 13	Couve	Altamira PA	2014	+	-	H8
B 2015 14	Couve	Núcleo Rural Alexandre Gusmão DF	2015	+	-	H9
B 2015 15	Couve	N. R. Alexandre Gusmão DF	2015	+	-	H1
B 2015 16	Couve	N. R. Alexandre Gusmão DF	2015	+	-	H14
B 2015 17	Couve	N. R. Alexandre Gusmão DF	2015	+	-	H1
B 2015 18	Couve	N. R. Alexandre Gusmão DF	2015	-	+	H8
B 2015 19	Couve	Gama DF	2015	+	-	H8
B 2015 30	Couve	Gama DF	2015	-	+	H1
B 2015 31	Couve	Gama DF	2015	-	+	H1
B 2015 32	Couve	Gama DF	2015	-	+	H9
B 2015 39	Couve	Brazlândia DF	2015	-	+	H5
B 2015 41	Couve	Brazlândia DF	2015	+	-	H20
B 2015 44	Couve	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H31
B 2015 45	Couve	N. R. Vargem Bonita DF	2015	-	+	H1
B 2015 46	Couve	N. R. Vargem Bonita DF	2015	-	+	H31
B 2015 47	Couve	N. R. Vargem Bonita DF	2015	-	+	H31
B 2015 54	Couve	Quitandinha PR	2015	+	-	H30
B 2015 56	Couve	Ibiúna SP	2015	+	-	H43
B 2015 58	Couve	São José dos Pinhais PR	2015	+	-	H10
B 2015 60	Couve	São José dos Pinhais PR	2015	-	+	H9
B 2015 69	Couve	Ibiúna SP	2015	-	-	H16
B 2016 72	Couve	Capim Branco MG	2016	+	-	H30
B 2016 73	Couve	Capim Branco MG	2016	+	-	H30
B 2017 88	Couve	N. R. Vargem Bonita DF	2017	+	-	H23
B 2017 89	Couve	N. R. Vereda DF	2017	+	-	H28
B 2017 94	Couve	Tijucas SC	2017	+	-	H33
B 2018 104	Couve	N. R. Vereda DF	2018	+	-	H44
B 2018 110	Couve	N. R. Capão da onça Brazlândia DF	2018	+	-	H19
B 2018 115	Couve	Brazlândia DF	2018	+	-	H59
B 2018 99	Couve	N. R. Vargem Bonita DF	2018	-	+	H28
B 2019 156	Couve	Tianguá CE	2019	+	-	H42
B 2019 157	Couve	Tianguá CE	2019	+	-	H36
B 2015 22	Couve chinesa	Angelina SC	2015	+	-	H40
B 2015 23	Couve chinesa	Angelina SC	2015	+	-	H40

B 2014 1	Couve-flor	Itatiba SP	2014	-	+	H38
B 2014 2	Couve-flor	Itatiba SP	2014	+	-	H5
B 2014 3	Couve-flor	Pinhalzinho SP	2014	+	-	H15
B 2014 4	Couve-flor	Pinhalzinho SP	2014	-	+	H12
B 2014 5	Couve-flor	Pinhalzinho SP	2014	+	-	H13
B 2014 6	Couve-flor	Pinhalzinho SP	2014	-	+	H12
B 2014 7	Couve-flor	Pinhalzinho SP	2014	+	-	H12
B 2014 8	Couve-flor	Pinhalzinho SP	2014	+	-	H63
B 2015 33	Couve-flor	N. R. Vargem Bonita DF	2015	-	+	H3
B 2015 34	Couve-flor	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H10
B 2015 40	Couve-flor	N. R. Vargem Bonita DF	2015	-	+	H41
B 2015 42	Couve-flor	Brazlândia DF	2015	+	-	H6
B 2015 43	Couve-flor	Brazlândia DF	2015	+	-	H40
B 2015 57	Couve-flor	N. R. Vargem Bonita DF	2015	+	-	H14
B 2015 64	Couve-flor	Munhoz MG	2015	+	-	H62
B 2015 65	Couve-flor	Munhoz MG	2015	+	-	H22
B 2015 66	Couve-flor	Munhoz MG	2015	-	-	H16
B 2016 82	Couve-flor	Ituporanga SC	2016	+	-	H35
B 2017 84	Couve-flor	São Sebastião do Paraíso MG	2017	+	-	H25
B 2018 102	Couve-flor	N. R. Vargem Bonita DF	2018	+	-	H56
B 2018 103	Couve-flor	N. R. Vargem Bonita DF	2018	-	+	H48
B 2018 123	Couve-flor	Padre Bernardo GO	2018	+	-	H50
B 2018 124	Couve-flor	Padre Bernardo GO	2018	+	-	H50
B 2018 125	Couve-flor	Padre Bernardo GO	2018	+	-	H51
B 2019 135	Couve-flor	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H26
B 2019 136	Couve-flor	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H26
B 2019 137	Couve-flor	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H26
B 2019 130	Mostarda selvagem	N. R. Vargem Bonita DF	2019	+	-	H54
B 2019 131	Mostarda selvagem	N. R. Vargem Bonita DF	2019	+	-	H54
B 2015 26	Rabanete	Antônio Carlos SC	2015	+	-	H27
B 2015 27	Rabanete	Antônio Carlos SC	2015	+	-	H22
B 2015 20	Repolho	Angelina SC	2015	-	-	H5
B 2015 28	Repolho	Gama DF	2015	+	-	H30
B 2015 71	Repolho	Aurora SC	2015	+	-	H30
B 2017 92	Repolho	Tijucas SC	2017	+	-	H27
B 2017 93	Repolho	São José dos Pinhais PR	2017	+	-	H33
B 2017 95	Repolho	Tijucas SC	2017	+	-	H7
B 2017 96	Repolho	Santo Antônio de Posse SP	2017	-	+	H30
B 2017 97	Repolho	Santo Antônio de Posse SP	2017	+	-	H8
B 2018 101	Repolho roxo	N. R. Vargem Bonita DF	2018	+	-	H47
B 2018 127	Repolho	Guarapuava PR	2018	+	-	H55
B 2018 128	Repolho roxo	Chã Grande PE	2018	-	-	H58



B 2018 129	Repolho roxo	Chã Grande PE	2018	+	-	H65
B 2019 132	Repolho	Cristalina GO	2019	+	-	H53
B 2019 133	Repolho	Cristalina GO	2019	+	-	H53
B 2019 134	Repolho	Cristalina GO	2019	+	-	H55
B 2019 138	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H50
B 2019 139	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H50
B 2019 140	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H46
B 2019 141	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H46
B 2019 142	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H45
B 2019 143	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H45
B 2019 144	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H45
B 2019 145	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H46
B 2019 146	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H45
B 2019 147	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H46
B 2019 148	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H46
B 2019 149	Repolho	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H45
B 2019 150	Repolho roxo	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H64
B 2019 151	Repolho roxo	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H45
B 2019 152	Repolho roxo	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H46
B 2019 153	Repolho roxo	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H46
B 2019 154	Repolho roxo	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H46
B 2019 155	Repolho roxo	N. R. Taquara DF	2019	+	-	H46
B 2020 159	Repolho	Cristalina GO	2020	+	-	H39
B 2020 160	Repolho	Cristalina GO	2020	+	-	H37
B 2020 161	Repolho	Cristalina GO	2020	+	-	H37
B 2020 162	Repolho	Cristalina GO	2020	+	-	H37
B 2020 163	Repolho	Cristalina GO	2020	+	-	H37
B 2020 164	Repolho	Cristalina GO	2020	+	-	H39
B 2020 165	Repolho	Cristalina GO	2020	+	-	H34
B 2020 166	Tomate (planta voluntária)	Cristalina GO	2020	+	-	H30

**Tabela 2.** Características dos isolados sequenciados: identificação, haplótipo, PCR multiplex (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *X. campestris* pv. *raphani*), patogenicidade em brócolis, couve e couve-flor, PCR para goma xantana, reação de hipersensibilidade em fumo

Isolado	Haplótipo	PCR		Patogenicidade	Goma Xantana <sup>3</sup>	Hipersensibilidade
		Xcc <sup>1</sup>	Xcr <sup>2</sup>			
B 2014 10	H29	+	-	-	+	+
B 2015 20	H5	+	-	-	+	+
B 2015 48	H3	+	-	-	+	+
B 2015 66	H16	+	-	-	+	+
B 2015 69	H16	+	-	-	+	+
B 2018 128	H59	+	-	-	+	+
B 2015 64	H62	+	-	+	+	+
B 2018 117	H59	+	-	+	+	+
B 2019 152	H46	+	-	+	+	+
B 2019 157	H36	+	-	+	+	+
B 2020 166	H30	+	-	+	+	+

<sup>1</sup> Xcc: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; <sup>2</sup> Xcr: *X. campestris* pv. *raphani*; <sup>3</sup>PCR específica para o gene *gumD* de acordo com as condições de Adriko et al. (2014).

### 3.2 - Sequenciamento do gene *housekeeping rpoD*

Todos os isolados selecionados para análise do sequenciamento, incluído os que apresentaram resultados conflitantes entre a patogenicidade e BOX-PCR (Tabela 3; Figura 2) foram identificados como Xcc. Com base na árvore gerada, foi possível distinguir dois clusters. No cluster 1, isolados B-2014-10, B-2015-20, B-2015-48, B-2015-64, B-2015-69 e B-2018-117 que estão próximos de isolados da Sérvia e do Brasil. Os isolados B-2015-66, B-2018-128, B-2019-152, B-2019-157 e B-2020-166 formaram um segundo cluster (Figura 1). Os patovares de *X. campestris*, *raphani* e *incanae* foram agrupados em um cluster separado.

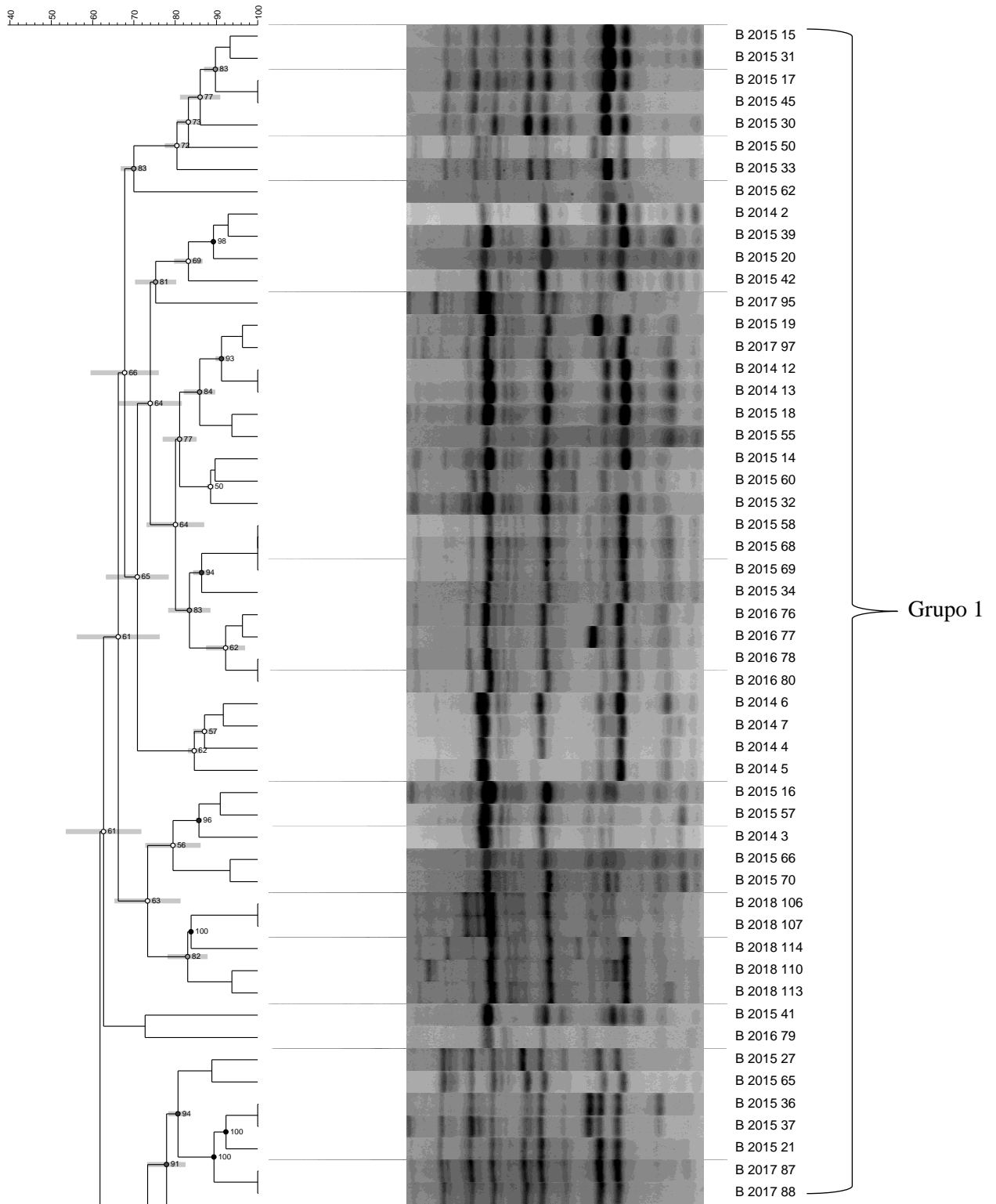


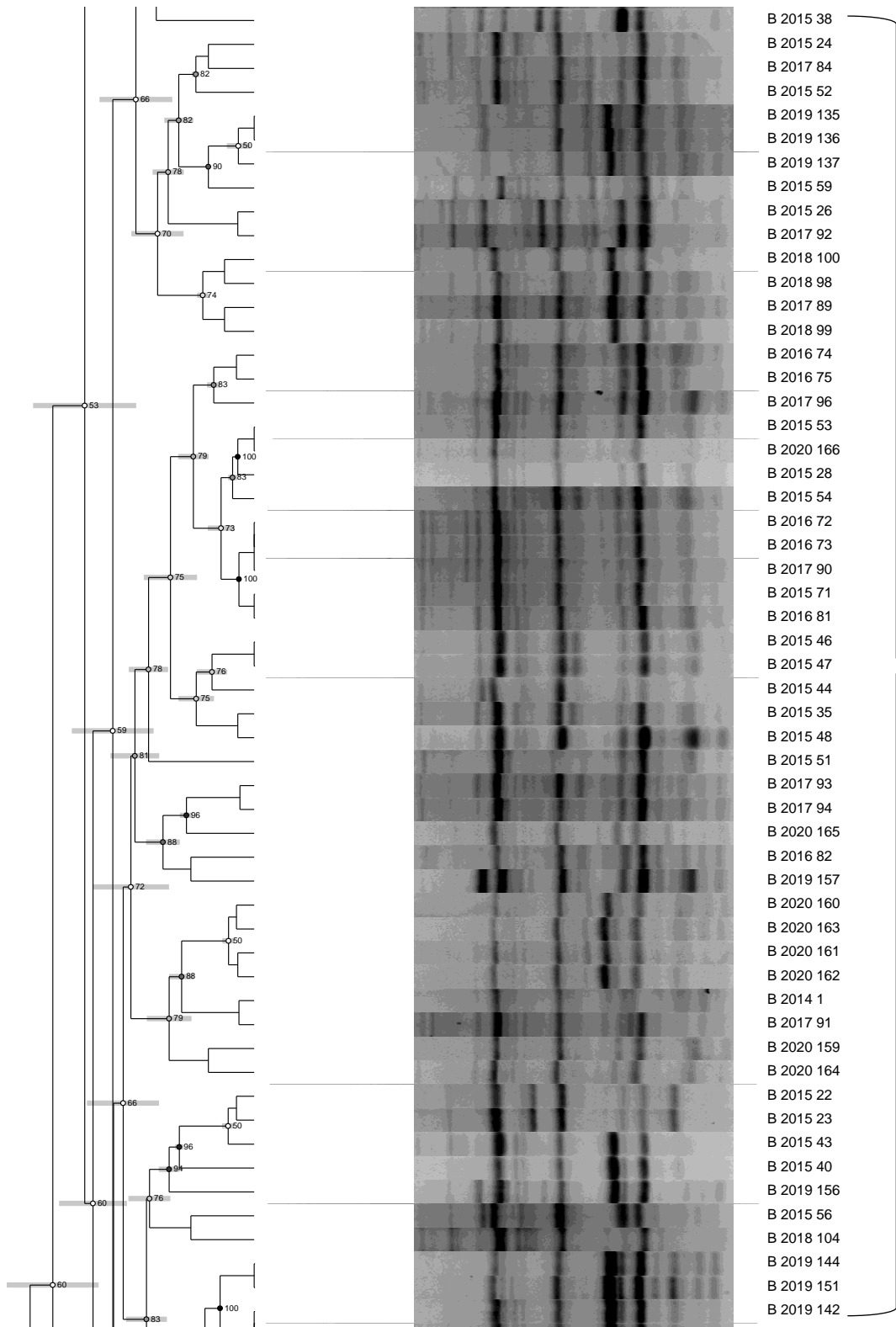
**Figura 1.** Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *rpoD*, construída por Neighbor-Joining com o modelo de Jukes-Cantor. A sequência de *Stenotrophomonas maltophilia* ICMP 170033 foi utilizada como *outgroup*. Bar: 0,02. Número de acesso dos isolados no GenBank está listado nos braços da árvore. Xcc: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

### 3.3 - Genotipagem com BOX-PCR

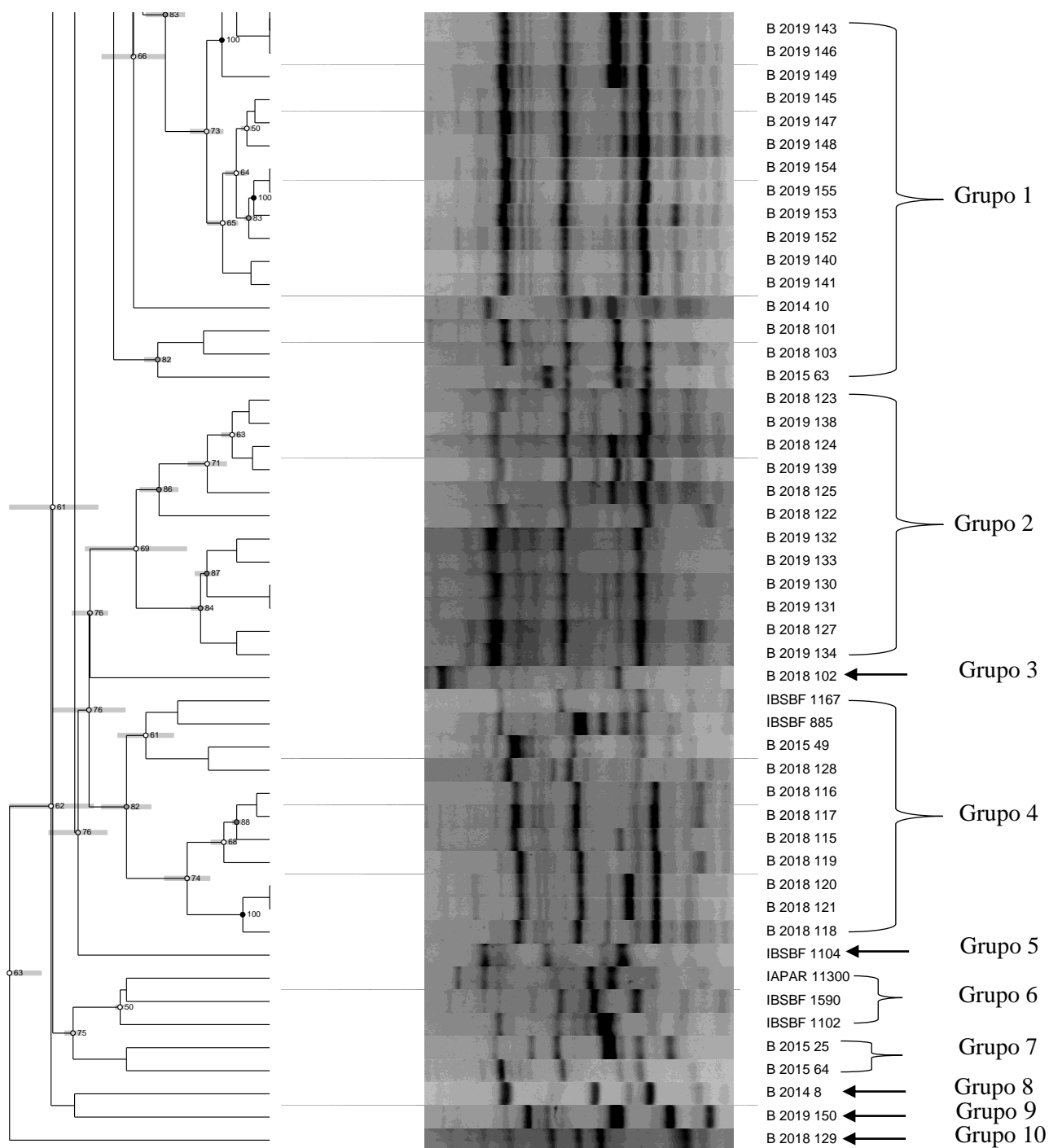
Os *amplicons* obtidos com a análise BOX-PCR dos 151 isolados variaram de 250 a 3000 bp, mas para a construção do dendrograma foram consideradas as bandas com melhor resolução entre 250 e 1500 bp. Um total de 65 haplótipos foram detectados entre os 151 isolados. O valor mínimo de similaridade entre os isolados, de acordo com a frequência de análise de similaridade dos três perfis genômicos gerados pelo mesmo isolado foi de 85,86%. Dez grupos foram definidos pela mesma análise de frequência (Figura 2). O ponto de corte para o Grupo 1 (49 haplótipos) foi de 63,67% de similaridade; para o Grupo 2 (seis haplótipos) houve 68,88% de similaridade; Grupo 3 (um haplótipo) teve 58,12% de similaridade; Grupo 4 (quatro haplótipos e Xcc: IBSBF-1167 e *X. campestris* pv. *aberrans*: IBSBF-885) teve 66,62% de similaridade; Grupo 5 (*X. campestris* pv. *aberrans*: IBSBF-1104) foi 55,35%; Grupo 6 (Xcr: IBSBF-1590, IAPAR-11300 e *X. campestris* pv. *armoraciae*: IBSBF-1102) foi de 65,15%; Grupo 7 (dois haplótipos) foi de 66,66%; Grupo 8 (um haplótipo) foi de 54,5%; Grupo 9 (um haplótipo) foi de 54,5%; e o Grupo 10 (um haplótipo) foi de 39,4%. Os perfis genômicos gerados não permitiram a distinção entre todos os patovares de *X. campestris*. Considerando a posição dos isolados de referência dos patovares no dendrograma, observou-se que as semelhanças máximas que agruparam com os isolados da coleção foram de 71,14%, entre Xcc IBSBF 1167, e os isolados B-2015-49 e B- 2018-128. O isolado de referência de *X. campestris* pv. *aberrans* IBSBF 885 foi agrupado no mesmo cluster que o isolado de referência Xcc. Os isolados de referência de *X. campestris* pv. *raphani*, IBSBF 1590 e IAPAR 11300, juntamente com o isolado de referência de *X. campestris* pv. *armoraciae*, IBSBF 1102 formou um grupo distinto (55,96%) dos isolados Xcc. O isolado de referência de *X. campestris* pv. *aberrans*, IBSBF 1104, foi o mais distante (46,16%) dos outros patovares. Os isolados que não eram patogênicos para plantas de *Brassica*, ficaram dispersos em vários clusters juntamente com isolados Xcc patogênicos

(Tabela 3). No cluster 1, 105 isolados de diferentes hospedeiros, origens geográficas e ano de isolamento foram agrupados. O mesmo ocorreu no cluster 2 com 44 isolados. Isolados B-2014-88, B-2015-25, B-2015-64, B-2018-102, B-2018-122, B-2018-129; B-2019-15 foram os mais divergentes (55,15%) do restante da coleção (Figura 2). Não houve correlação entre clusters e hospedeiras, origem geográfica ou ano de isolamento.





Grupo 1



**Figura 2.** Dendrograma gerado a partir da comparação dos perfis genômicos obtidos por BOX-PCR de 151 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* agente causal da podridão negra em brássicas e isolados de referência (IBSBF e IAPAR). A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA e o coeficiente de Dice usado para cálculo de similaridade. IBSBF 1167; IBSBF 1590 e IAPAR 11300; IBSBF 1102; IBSBF 1104 e IBSBF 885 são os isolados referências para *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv.

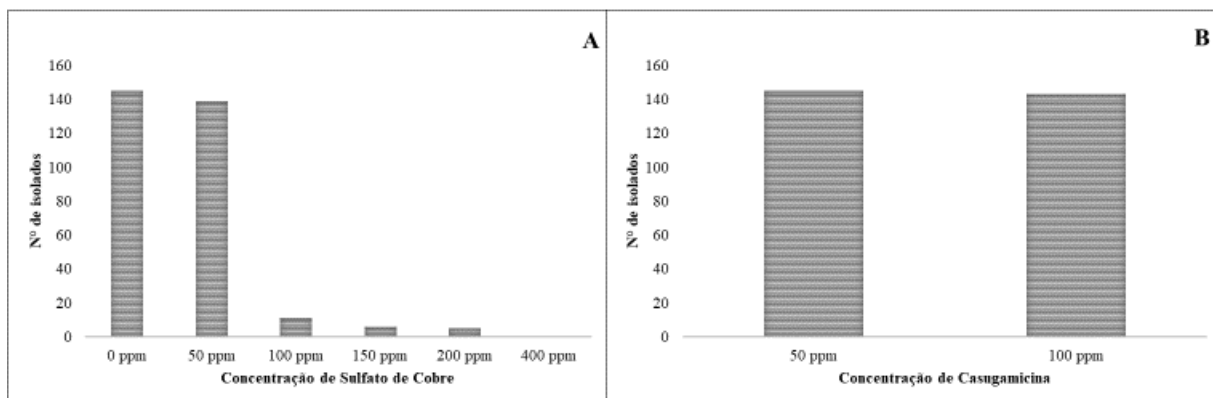


*raphani*, *X. campestris* pv. *armoraciae*, *X. campestris* pv. *aberrans*, respectivamente. Similaridade mínima limítrofe para definição de haplótipos de Xcc (85,86%).

### 3.4 - Teste de sensibilidade ao cobre e a casugamicina *in vitro*

Todos os 145 isolados cresceram em meio MMCC sem o cobre e com 20 µg/mL de sulfato de cobre e 139 isolados cresceram a 50 µg/mL do produto químico. Onze isolados cresceram à concentração de 100 µg/mL, seis isolados tiveram maior tolerância, e cresceram a 150 µg/mL. Cinco isolados apresentaram maior insensibilidade ao cobre suplantado no meio, cresceram a 200 µg/mL. Nenhum isolado cresceu na maior concentração testada de 400 µg/mL de cobre (Figura 3).

Os isolados que cresceram a 100 µg/mL são originários dos estados de São Paulo (B-2014-5), Santa Catarina (B-2015-28), Goiás (B-2020-159) e Distrito Federal (B-2017-90, B-2018-102, B-2018-107 e B-2018-110; B-2019-146 e B-2019-155). Os isolados que foram insensíveis ao cobre crescendo a 200 µg/mL foram: B-2017-90, B-2018-102 e B-2018-110, B-2019-154 e B-2020-159). Esses isolados foram coletados tanto em cultivos de agricultura familiar, quanto em grandes produtores. Quanto ao teste *in vitro* de sensibilidade ao antibiótico casugamicina, 143 isolados foram insensíveis ao antibiótico, somente dois isolados: B-2014-8, originário de São Paulo e B-2015-36 do Distrito Federal, não cresceram nas concentrações de 50 e 100 µg/mL (Figura 3).



**Figura 3.** Sensibilidade in vitro de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a diferentes concentrações de cobre (A) e casugamicina (B).

### 3.5 - Determinação das raças de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Cinco raças foram detectadas no Brasil, com predomínio da raça 4 (54,43%) e raça 1 (32,91%) (Tabela 3). Com relação aos estudos de caso do Núcleo Rural de Taquara, Planaltina, DF, dos 21 isolados coletados em lavouras adjacentes de couve-flor (três isolados) e repolho (18 isolados), dois foram identificados como raça 4 e 19 como raça 1. Enquanto na cultura de repolho em Cristalina, GO, um isolado da raça 1, dois isolados da raça 3 e quatro isolados da raça 4 foram encontrados. O isolado de tomate foi identificado como raça 4, que também está presente entre isolados de repolho do mesmo campo. Os dois isolados pertencentes à raça 6 foram identificados em mostarda selvagem. Os isolados identificados como raça 9 são dos segmentos de repolho, brócolis, couve-flor, de diferentes locais e anos de coleta.

**Tabela 3.** Distribuição das raças de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em 79 isolados coletados de diversas brássicas.

Raça	Genótipos diferenciais								Total de isolados
	Wirosa F1 <sup>1</sup>	JRHT <sup>2</sup>	COB60 <sup>3</sup>	STT <sup>4</sup>	PIC 1 <sup>5</sup>	FBLM2 <sup>6</sup>	Miracle F1 <sup>7</sup>	SxD1 <sup>8</sup>	
1	+	+	+	+	-	-	+	+	26
3	+	+	+	+, v	-	-	- / (+)	-	3
4	+	-	-	-, v	-	-	+	+	43
6	+	+	+	+	+	+	+	+	2
9	+	-	-	-	-	-	-	-	5

+, reação compatível; -, reação incompatível; (+) fracamente patogênico; v, variável

<sup>1</sup>Wirosa F1 (*Brassica oleracea*), <sup>2</sup>Just Right Hybrid Turnip (*B. rapa*), <sup>3</sup>COB60 (*B. napus*), <sup>4</sup>Seven Top Turnip (*B. rapa*), <sup>5</sup>PIC 1 (*B. carinata*), <sup>6</sup>Florida Broad Leaf Mustard (*B. juncea*), <sup>7</sup>Miracle F1 (*B. oleracea*), <sup>8</sup>SxD1 (*B. oleracea*)

#### 4 - Discussão

A podridão negra em brássicas causada por Xcc leva a grandes perdas de produtividade em todo mundo (Vicente e Holub, 2013). Apesar de estar presente no Brasil desde 1935 (Silveira, 1949), poucos estudos para caracterizar o patógeno foram feitos (Peruch et al. 2006; Santos et al. 2008; Silva, 2008; Melo, 2012). Esses estudos abrangeram poucos isolados e/ou amostragens em poucos estados brasileiros. Neste estudo, 144 isolados coletados de quatro variedades de brássicas, três espécies da família Brassicaceae e um isolado coletado de tiguera de tomate foram caracterizados pela morfologia da colônia, testes de patogenicidade e por PCR multiplex (Leu et al. 2010), tendo sua identidade confirmada como Xcc. Outros seis isolados, que não foram patogênicos a brócolis, couve e couve-flor, tiveram sua identidade confirmada como Xcc e pela análise parcial da sequência do gene *housekeeping rpoD*.

No presente estudo, a grande maioria dos isolados induziu sintomas após 7 dias de inoculação, enquanto para alguns isolados os sintomas só foram observados após 10 dias de

inoculação. Variações na agressividade em Xcc já foram relatadas e independem da origem geográfica ou raça (Cruz et al. 2017). Essa variação também foi relatada em isolados brasileiros associada à especificidade de hospedeiros. Miguel-Wruck et al. (2010) observaram que, dos 33 isolados obtidos de várias regiões do Brasil e do exterior inoculados em oito espécies de brássicas, a maioria apresentou relativo grau de especificidade, pois não causaram doença em uma ou mais das brássicas inoculadas. A perda de virulência de alguns isolados já havia sido relatada por Vicente et al. (2001) que a atribuiu às condições de preservação. Além disso, a ausência de genes do cluster *hrp* poderia explicar a avirulência dos isolados que não induziram sintomas em nenhuma das brássicas inoculadas (Kamoun et al. 1992). De acordo com Cruz et al. (2017) para alguns isolados de *X. campestris* não foram obtidos *amplicons* para o gene *hrpF* e eles não foram patogênicos a nenhum dos genótipos de *B. oleracea* testados.

Atualmente, nove raças são propostas para Xcc, sendo as raças 1 e 4 predominantes no mundo (Vicente e Holub, 2013). Diversos estudos identificaram somente essas raças nas populações de Xcc analisadas, como o do leste da África (Mulema et al. 2012) e da Índia (Singh et al. 2016). Já Bila et al. (2013) encontraram somente isolados da raça 1 na população de Moçambique. Dos 79 isolados que foram selecionados para o teste de raça, 43 isolados foram identificados como raça 4, 26 isolados como raça 1 confirmando assim a predominância dessas raças nos isolados brasileiros, o que poderia estar relacionado ao mercado internacional das sementes em todo o mundo. Ignatov et al. (2007) encontraram uma alta frequência de raça 6 em populações de brássicas alternativas na Califórnia, e Lema et al. (2012) encontrou a raça 6 somente em *B. rapa* na Espanha. Os dois únicos isolados da raça 6 foi encontrada em uma brássica selvagem, crescendo espontaneamente na couve-flor. No campo de cultivo de brássicas em Planaltina-DF houve baixa variabilidade de raças, somente as raças 1 e 4 foram encontradas, sendo 2 isolados da raça 4 nas áreas adjacentes de cultivo de

couve-flor e repolho, e 19 isolados da raça 1. Houve uma alta variabilidade de raças encontradas em cultivo de repolho em Cristalina, GO, estando presente no campo duas cultivares, uma em maior área e a outra apenas uma pequena faixa. Dos oito isolados de Xcc obtidos nessa lavoura foram encontradas três raças. Esse número de raças encontrado pode ser em função da variabilidade já presente nas mudas das duas cultivares, ou ainda da variabilidade entre cultivos anteriores na área, permanecendo o patógeno de uma safra para outra em restos culturais e/ou plantas alternativas e/ou ainda em plantas voluntárias de tomate. Assim, novas populações de Xcc podem ser inseridas nos diferentes plantios. Nessa área, de uma planta voluntária de tomate com lesões necróticas foliares, foi obtido um isolado identificado como Xcc, pertencente à raça 4, detectada na lavoura de repolho em que a planta de tomate se encontrava, constituindo assim o tomateiro uma nova possível hospedeira para esse patógeno. Esse é, possivelmente, o primeiro relato de tomate como hospedeira de Xcc. Ressalta-se que a referida área é principalmente cultivada com tomate para o processamento industrial, sendo, portanto, importante verificar o grau de adaptabilidade, potencial patogênico dessa bactéria à cultura do tomateiro, caso essas duas hospedeiras passem a coexistir em situações agrícolas. Essas adaptações a outras espécies de plantas já estão relatadas em diversas culturas por exemplo, alguns isolados de *X. campestris* pv. *raphani* (agente causal da mancha foliar em brássicas) passaram a infectar espécies de solanáceas, como o tomate e foram isolados no Canadá (Kuflu e Cupples 1997) e Rússia (Punina et al. 2009). Isolados de *X. vasicola* pv. *vasculorum* (agente causal da gomose em cana de açúcar) causaram a morte de clones de *Eucalyptus grandis* na África do Sul (Coutinho et al. 2015)

A análise de fingerprint utilizando elementos repetitivos do genoma bacteriano, tais como REP, ERIC e BOX, têm sido amplamente utilizada para avaliar a diversidade genética de Xcc em diversos países como Israel (Valverde et al. 2007), Itália (Zaccardelli et al. 2008), Nepal (Jensen et al. 2010), Espanha (Lema et al. 2012), Índia (Singh et al. 2016), Estados

Unidos (Lange et al. 2016), Portugal (Cruz et al. 2017), Taiwan (Burlakoti et al. 2018) Neste estudo, a análise foi conduzida somente com o *primer* BOXA1R que gerou mais bandas reproduzíveis do que os *primers* ERIC e REP, o que também foi verificado por Lema et al. (2012). Em estudos anteriores, análises dos perfis genômicos permitiram a diferenciação da maioria dos isolados ao nível de patovar (Vicente et al. 2006; Jensen et al. 2010), no entanto, nesse estudo os patovares *campestris* e *aberrans* se agruparam em um mesmo cluster, e os demais patovares agruparam-se em um cluster distinto. Uma grande diversidade de perfis genômicos foram identificados na coleção, totalizando 65 haplótipos, sendo 32 haplótipos únicos, ou seja, haplótipos que foram representados uma única vez. O mesmo resultado foi reportado por Singh et al. (2016) e Cruz et al. (2017). Não se detectou correlação entre haplótipo, origem geográfica e tipo de hospedeira, o que também foi observado por Lema et al. (2012) e Popovic et al. (2019) para isolados coletados na Espanha e Sérvia, respectivamente. Embora, Vicente et al. (2006) e Jensen et al. (2010) tivessem verificado que a maioria dos isolados de Xcc pertencente à mesma raça apresentaram perfis genômicos similares, na presente análise de isolados brasileiros, não se observou essa congruência. Os 79 isolados que foram classificados em cinco raças foram distribuídos aleatoriamente no dendrograma, não permitindo o estabelecimento de relação entre raça e haplótipo.

A análise filogenética baseada no sequenciamento genes *housekeeping* tem sido utilizada em vários estudos filogenéticos (Fargier e t al. 2011; Lange et al. 2016; Cruz et al. 2017; Bella et al.2019). No presente estudo, esta técnica foi utilizada para identificação de isolados que, embora PCR positivos para Xcc, não eram patogênicos. Confirmou-se também a identidade dos haplótipos predominantes dos quatro hospedeiros principais: brócolis, couve, couve-flor e repolho, e do isolado obtido da tiguera de tomate. A topologia da árvore filogenética com base no sequenciamento parcial do gene *rpoD* confirmou a identificação dos isolados em nível de espécie e patovar. Isolados portugueses também tiveram suas identidades

confirmadas com base no sequenciamento do gene *gyrB* (Cruz et al. 2017). Nos seus estudos, Fargier et al. (2006), utilizando abordagem MLSA com oito genes *housekeeping* (*atpD*, *dnaK*, *efP*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD*, *tpiA* e *fyuA*), revelou que quatro deles (*dnaK*, *gyrB*, *rpoD* e *fyuA*) são idênticos em sua utilidade para identificar *Xanthomonas* em nível de gênero, espécie e patovar. Entretanto, uso de *rpoD* ou *gyrB* sozinhos podem fornecer uma melhor compreensão da taxonomia de *Xanthomonas* do que aqueles baseados na região 16S-23S (Parkinson et al. 2007). No presente estudo escolheu-se o gene *rpoD* para confirmar a identidade dos isolados.

Além da abordagem genotípica, realizou-se um estudo fenotípico para avaliar a sensibilidade dos isolados ao cobre e a casugamicina *in vitro*. Demonstrou-se que um pequeno número de isolados de Xcc é resistente ao cobre, mas há uma prevalência de isolados resistentes à casugamicina no Brasil. Somente 3,45% dos isolados cresceram em 200 µg/mL de sulfato de cobre, sugerindo uma baixa pressão de seleção para resistência ao cobre, visto que o único produto registrado (Cuprozeb) para o uso em brássicas tem em sua formulação pequena concentração de cobre ativo (30% de oxiclreto de cobre equivalente a 17% de cobre metálico). A existência de isolados resistente ao cobre já foi relatada em isolados brasileiros. Santos et al. (2008) verificaram que todos os isolados eram resistentes ao sulfato de cobre na concentração de 50 µg/mL e todos foram tolerantes na concentração de 200 µg/mL. Entretanto, Lugo et al. (2013) estudando isolados de Trinidad e Tobago encontraram uma alta prevalência de resistência ao cobre na população de Xcc, 54% dos isolados eram resistentes, esses níveis de resistência estariam diretamente relacionados ao período de utilização de formulações a base de cobre. Já para o antibiótico casugamicina, quase todos os isolados cresceram na concentração de 100 µg/mL. Santos et al. (2008) encontraram isolados de Xcc de sistemas de produção orgânica em Pernambuco resistentes a diversos antibióticos, como: amoxicilina, gentamicina e norfloxacin. A resistência a casugamicina pode ser explicada por um possível uso em plantações de brássicas no Brasil, pois é o único antibiótico registrado

para uso em lavouras de brássicas no Brasil, apesar de não ser indicado para controle de Xcc (Brasil 2020). No entanto, não há dados disponíveis que possam apoiar essa hipótese.

## **5 - Conclusão**

A identidade de 150 isolados bacterianos provenientes de sete espécies do gênero *Brassica* e um isolado de planta voluntária de tomate foi elucidada. Todos os 151 isolados foram identificados como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Não foi detectada a presença do patovar *raphani* na coleção estudada. Alta variabilidade entre os isolados de Xcc foi observada com 65 haplótipos e cinco raças distintas, predominando as raças 1 e 4. Uma nova associação entre Xcc e tomateiro foi encontrada, sendo o possível primeiro relato. A maioria dos isolados de Xcc foi sensível a altas concentrações de cobre *in vitro*. Em contraste, a maioria dos isolados foi insensível a altas concentrações de casugamicina. Os resultados aqui gerados sobre a variabilidade genotípica e fenotípica de Xcc no Brasil são importantes para os programas de melhoramento e manejo da doença.



## 6 - Referências Bibliográficas

---

- Adriko J, Mbega ER, Mortensen CN, Wulff EG, Tushemereirwe WK, Kubiriba J, Lund OS (2014) Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. *European Journal of Plant Pathology* 138:293-306.
- Afrin KS, Rahim MA, Rubel MH, Natarajan S, Song JY, Kim HT, Nou IS (2018) Development of race-specific molecular marker for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 3, the causal agent of black rot of crucifers. *Canadian Journal of Plant Science* 98:1119–1125.
- Agrofit (2020) Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 26 de outubro de 2020.
- Bella P, Moretti C, Licciardello G, Strano CP, Pulvirenti A, Alaimo S, Catara V (2019) Multilocus sequence typing analysis of Italian *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains suggests the evolution of local endemic populations of the pathogen and does not correlate with race distribution. *Plant Pathology* 68:278–287.
- Berg T, Tesoriero L, Hailstones DL (2005) PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. *Plant Pathology* 54:416–427.
- Bila J, Mortensen CN, Andresen M, Vicente JG, Wulff EG (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 1 is the main causal agent of black rot of Brassicas in Southern Mozambique. *African Journal of Biotechnology* 12:602–610.
- Burlakoti RR, Chen JR, Hsu CF, Burlakoti P, Kenyon L (2018) Molecular characterization, comparison of screening methods, and evaluation of cross-pathogenicity of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) strains from cabbage, choy sum, leafy mustard and pak choi from Taiwan. *Plant Pathology* 67:1589-1600.
- Cruz J, Tenreiro R, Cruz L (2017) Assessment of diversity of *Xanthomonas campestris* pathovars affecting cruciferous plants in Portugal and disclosure of two novel

- X.campestris* pv. *campestris* races. Journal of Plant Pathology 99:403–414.
- Coutinho T, Van der Westhuizen L, Roux J, McFarlane S, Venter S (2015) Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. Plant Pathology 64:576-581
- Fargier E, Manceau C (2007) Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. Plant Pathology 56:805–818.
- Fargier E, Saux MF Le, Manceau C (2011) A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. Systematic and Applied Microbiology 34:156–165.
- Griesbach E, Löptien H, Miersch U (2003) Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson in cabbage *Brassica oleracea* L. Journal of Plant Diseases and Protection 110: 461-475.
- Ignatov A, Sechler A, Schuenzel EL, Agarkova I, Oliver B, Vidaver AK, Schaad NW (2007) Genetic diversity in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cruciferous weeds in central coastal California. Phytopathology 97: 803-812.
- Jensen BD, Vicente JG, Roberts SJ, Manandhar HK (2010) Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal. Plant Disease 94: 298–305.
- Kamoun S, Kamdar HV, Tola E, Kado CI 1992 A vascular hypersensitive response: role of the hrpK locus. Molecular Plant Microbe Interaction 5: 22-33.
- Krauthausen HJ, Laun N, Wohanka W (2011) Methods to reduce the spread of the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, in brassica transplants. Journal of Plant Diseases and Protection 118: 7-16.
- Kuflu KM, Cuppels DA (1997) Development of a diagnostic DNA probe for xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. Applied Environmental Microbiology 63: 4462–70

- Lange HW, Tancos MA, Carlson MO, Smart CD (2016) Diversity of *Xanthomonas campestris* isolates from symptomatic crucifers in New York State. *Phytopathology* 106: 113-122.
- Lema M, Cartea ME, Sotelo T, Velasco P, Soengas P (2012) Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by *Brassica* spp. genotypes and rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 133: 159–169.
- Leu YS, Deng WL, Yang WS, Wu YF, Cheng AS, Hsu ST, Tzeng KC, Yang WS (2010) Multiplex Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *X. campestris* pv. *raphani*. *Plant Pathology Bulletin* 137–147
- Lugo AJ, Elibox W, Jones JB, Ramsuhag A (2013) Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. *European Journal of Plant Pathology* 136: 61–70.
- Maji ATIT, Nath R (2015) Pathogenecity test by using different inoculation methods on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* caused of black rot of cabbage. *International Journal of research in Applied Natural and Social Sciences* 3: 53-58.
- Melo EA (2016) Estrutura de população e caracterização filogenética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brasil.
- Melo RA, Vendrame LP, Madeira NR, Blind AD, Vilela NJ (2019) Characterization of the Brazilian vegetable brassicas production chain. *Horticultura Brasileira*, 37: 366-372.
- Miguel-Wruck DS, Oliveira JRD, Dias LADS (2010) Especificidade de hospedeiro nas interações *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*-brássicas. *Summa Phytopathologica* 36: 129-133.
- Mulema JMK, Vicente JG, Pink DAC, Jackson A, Chacha DO, Wasilwa L, Hand P (2012) Characterization of isolates that cause black rot of crucifers in East Africa. *European Journal of Plant Pathology* 133: 427–438.
- Popović T, Mitrović P, Jelušić A, Dimkić I, Marjanović-Jeromela A, Nikolić I, Stanković S

- (2019) Genetic diversity and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from *Brassica napus* and six *Brassica oleracea* crops in Serbia. *Plant Pathology* 68: 1448-1457.
- Rathaur PS, Singh D, Raghuwanshi R, Yadava DK (2015) Pathogenic and genetic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races based on rep-PCR and multilocus sequence analysis. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 6: 317.
- Rubel MH, Natarajan S, Nath UK, Denison MIJ, Hee-Jeong J, Hoy-Taek K, Ill-Sup N (2019) Development of a marker for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races 1 and 2 in *Brassica oleracea*. *Horticulture, Environmental and Biotechnology* 60: 511-517.
- Rubel MH, Robin AHK, Natarajan S, Vicente JG, Kim HT, Park JI, Nou IS (2017) Whole-genome re-alignment facilitates development of specific molecular markers for races 1 and 4 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the cause of black rot disease in brassica oleracea. *International Journal of Molecular Science* 18:1–15.
- Santos LAD, Bandeira DDA, da Silv JP, da Silveira EB, Gomes AMA, Mariano RDL (2008) Caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de sistemas de produção orgânico e reação de brássicas à podridão-negra. *Horticultura Brasileira* 26: 486-491.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W, eds, (2001) *Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd edn. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Silva MR (2006) Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Brasil. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Silveira VD (1949) Doenças bacterianas. In: Silveira V.D. (Ed.) *Elementos de fitopatologia: agronomia*. Rio de Janeiro. pp. 207-247.
- Singh D, Raghavendra BT, Rathaur PS, Singh H, Raghuwanshi R, Singh RP (2014) Detection of black rot disease causing pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by bio-PCR from seeds and plant parts of cole crops. *Seed Science and Technology* 42: 36-46.
- Singh D, Rathaur PS, Vicente JG (2016) Characterization, genetic diversity and distribution

- of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot disease in cruciferous crops of India. *Plant Pathology* 65: 1411–1418.
- Parkinson N, Aritua V, Heeney J, Cowie C, Bew J, Stead D (2007) Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2881–2887.
- Peruch LA, Michereff SJ, Araújo IB (2006) Levantamento da intensidade da alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. *Horticultura Brasileira* 24: 464-469.
- Pohronezny K, Sommerfeld ML, Raid RN (1994) Streptomycin resistance and copper tolerance among strains of *Pseudomonas cichorii* in celery seedbeds. *Plant disease* 78: 150-153.
- Punina NV, Ignatov AN, Pekhtereva ES, Kornev KP, Matveeva EV (2009). Occurrence of *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* on tomato plants in the Russian Federation. *Acta Horticulture* 808:287–90
- Young JM, Park DC, Shearman HM, Fargier E (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and applied microbiology* 31: 366-377.
- Valverde A, Hubert T, Stolov A, Dagar A, Kopelowitz J, Burdman S (2007) Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. *Plant Pathology* 56: 17-25.
- Vicente JG, Conway J, Roberts SJ, Taylor JD (2001) Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and related pathovars. *Phytopathology* 91: 492–499.
- Vicente JG, Taylor JD, Sharpe AG, Parkin IAP, Lydiate DJ, King GJ (2002) Inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica genomes. *Phytopathology* 92: 1134–1141.
- Vicente JG, Holub EB (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* 14: 2–18.

Williams PH, Staub T, Sutton JC (1972) Inheritance of resistance in cabbage to black rot.  
Phytopathology 62: 247–252.

# Capítulo 3

---

---

**Reação de genótipos de couve-flor a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*,  
agente causal da podridão negra no Distrito Federal**

## Reação de genótipos de couve-flor a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra no Distrito Federal

### Resumo

A podridão negra [*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc)] é uma das principais doenças em couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). O uso de cultivares resistentes a Xcc é considerada uma das principais medidas de controle. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar onze cultivares comerciais de couve-flor quanto à resistência à podridão negra, além de avaliar a estabilidade da resistência de duas cultivares frente a um conjunto de isolados de haplótipos distintos de Xcc. Para tanto, conduziu-se em 2018 a 2020 dois ensaios em casa de vegetação e um em campo experimental. As plantas foram inoculadas por pulverização com o isolado B-2015-51. Avaliou-se as seguintes variáveis: relação entre diâmetros (*ratio*), número total de folhas, peso da inflorescência, produtividade das cultivares e severidade. As cultivares testadas foram: Cindy, Sarah, Sharon, Verona, EACF 2000, Veridiana, Shiro, Piracicaba de Verão, Vera F1, Vigo F1 e Champagne Snow. O ensaio de estabilidade da resistência foi conduzido em casa de vegetação com as cultivares Sarah e Cindy, que foram escolhidas por serem bastante comercializadas no país. O híbrido EACF 2000 apresentou menor severidade em casa de vegetação. A cultivar Piracicaba de Verão teve a menor severidade em campo. Já as cultivares mais produtivas foram Vera F1 (19,64 t ha<sup>1</sup>), Verona (17,18 t ha<sup>1</sup>) e Veridiana (17,15 t ha<sup>1</sup>). No ensaio de estabilidade, a resistência intermediária de Sarah foi confirmada. Assim, nas condições edafoclimáticas, aliando tolerância à podridão negra e produtividade, as cultivares Vera F1, Verona e Veridiana podem ser recomendadas para plantio de verão na região do Distrito Federal.

**Palavras-chaves:** *Brassica oleracea* var. *botrytis*, produtividade, resistência, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.



## **Abstract**

Black rot [*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc)] is one of the main diseases of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). The use of Xcc resistant cultivars is considered one of the main control measures. The objectives of this work were: to evaluate eleven commercial cauliflower cultivars for resistance to black rot, in addition to evaluating the resistance stability against a set of isolates of different Xcc haplotypes. Thus, two tests were carried out in a greenhouse and in an experimental field, conducted in 2019. The plants were inoculated by spraying with the isolate B-2015-51. The following variables were evaluated: relationship between diameters (ratio), total number of leaves, weight of inflorescence, cultivar productivity and severity. The tested cultivars were Cindy, Sarah, Sharon, Verona, EACF 2000, Veridiana, Shiro, Piracicaba de Verão, Vera F1, Vigo F1 and Champagne Snow. The resistance stability test was carried out in a greenhouse experiment with the cultivars Sarah and Cindy, which were chosen as they are widely commercialized in the country. The EACF 2000 hybrid showed less severity in a greenhouse. The cultivar Piracicaba de Verão had less severity in the field. The most productive cultivars were Vera F1 (19.64 t ha<sup>-1</sup>), Verona (17.18 t ha<sup>-1</sup>) and Veridiana (17.15 t ha<sup>-1</sup>). In the stability test, Sarah's intermediate resistance was confirmed. Thus, under edaphoclimatic conditions, combining black rot tolerance and yield, the cultivars Vera F1, Verona and Veridiana can be recommended for summer planting in the Federal District region.

**Keywords:** *Brassica oleracea* var. *botrytis*, productivity, resistance, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

## 1 - Introdução

A couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L. Família: Brassicaceae) é nativa da região do Mediterrâneo, precisamente na Turquia e Itália, e uma das hortaliças mais importantes do mundo (Gregory 2015). Atualmente é cultivada em diversos países, sendo os maiores produtores China com 10,6 milhões de toneladas, Índia (8,8 milhões), Estados Unidos (1,2 milhões), México (728 mil), Espanha (725 mil) e Itália (368 mil) (FAOSTAT 2020). A produção brasileira foi de aproximadamente de 329 mil toneladas em 11.000 hectares (Melo et al. 2019). No Brasil, os maiores produtores se concentram nas regiões sul e sudeste, com destaque para os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná (Melo et al. 2019).

A produção da couve-flor depende de uma série de fatores que são limitantes para produção, tais como, tipo de solo, clima, cultivares, práticas de manejo cultural, incidência de pragas e doenças (May et al. 2007). Dentre as doenças que acometem a cultura, a podridão negra das cricíferas (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (Pammel) Dowson) é a principal doença bacteriana, resultando em consideráveis perdas na produção e qualidade, ocorrendo em até 88,9% das plantações de couve-flor (Peruch et al. 2006). A doença é favorecida por altas temperaturas e umidade do ar, o que a torna uma das doenças mais comuns, principalmente no período chuvoso (Maringoni 2005). O patógeno penetra na planta pelas aberturas naturais, principalmente pelos hidatódios, e ferimentos causados por insetos, animais, chuva, irrigação, vento e tratos culturais.

O principal sintoma da podridão negra é a lesão clorótica em forma de “V” com o vértice em direção ao centro do limbo foliar. O patógeno torna-se sistêmico invadindo as nervuras secundárias e a nervura principal da folha, que enegrecem progressivamente, enquanto a bactéria atinge o caule e a raiz. O escurecimento dos tecidos vasculares da origem

ao nome comum da doença podridão negra (Maringoni 2005). Os tecidos afetados podem se tornar necróticos e as folhas podem cair prematuramente; infecções sistêmicas podem causar crescimento atrofiado e a morte de plantas jovens (Vicente e Holub 2013). É uma doença transmitida pelas sementes (Tonguc e Griffiths 2004). Além disso, a doença se espalha por meio de gotas de chuva e o patógeno sobrevive em restos culturais e plantas daninhas (Silva Junior et al. 2020).

A principal forma de controle da podridão negra é a prevenção, por meio de uso de sementes saudáveis, tratamento de sementes, eliminação de fonte de inóculo (restos de cultura infectados e plantas daninhas) e adoção de práticas agrícolas que limitem a disseminação da doença, incluindo programas de irrigação e rotação de culturas (Arias et al. 2000; Roberts et al. 2007). Entretanto, a forma mais eficiente de controle da doença é a utilização de cultivares resistentes (Villett et al. 2009). A utilização de cultivares e/ou híbridos resistentes tem sido reconhecida como uma das estratégias mais econômicas e eficazes (Saha et al. 2015 Afrin et al. 2018).

Numerosos estudos foram realizados para avaliar a resistência a podridão negra em cultivares de brássicas, repolho (Henz e Melo 1994), brócolis (Seabra Junior et al. 2007), diversas brássicas em sistema de cultivo orgânico (Santos et al. 2008) e couve-flor (Morais Junior et al. 2012; Silva et al. 2015). Assim, a avaliação da resistência de cultivares de couve-flor a podridão negra é muito importante para a recomendação de cultivares para cultivos em determinadas regiões e épocas e seleção de fontes de resistência (Morais Junior et al. 2012). Tais informações, associadas ao desempenho produtivo do material, permitirão recomendar o melhor material para cultivo na região onde o estudo foi realizado (May et al. 2007). Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar onze genótipos de couve-flor quanto a resistência a podridão negra no período chuvoso no Distrito Federal.

## 2 - Material e métodos

### 2.1 - Localização da área experimental

Os ensaios foram conduzidos em campo experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças), em Brasília, DF, situada nas seguintes coordenadas geográficas 15°56'00" latitude Sul, 48°08'00" latitude Oeste e com altitude em relação ao nível do mar de 997 metros. O clima predominante na região é o clima tropical com estação seca, sendo classificado por Koppen-Geiger como Aw, com épocas secas bem definidas, caracterizado pela presença de duas estações: chuvosa (entre outubro a abril) e outra seca (de maio a setembro).

### 2.2 - Instalação e condução dos ensaios de avaliação dos genótipos de couve-flor

Foram conduzidos dois ensaios, sendo um em casa de vegetação e um em campo experimental (Tabela 1). As cultivares foram definidas pela disponibilidade no mercado local e fornecimento de sementes pelas empresas fabricantes.

**Tabela 1.** Ensaios conduzidos e cultivares avaliadas.

Ensaio	Época	Cultivares
Ensaio 1 (casa de vegetação)	Out- Dez/2018	Cindy <sup>1</sup> , Sarah <sup>1</sup> , Sharon <sup>1</sup> , Verona <sup>2</sup> , EACF 2000 <sup>3</sup> , Shiro <sup>4</sup> , Piracicaba de Verão <sup>5</sup> , Vera F1 <sup>6</sup> , Vigo F1 <sup>7</sup> , Champagne Snow <sup>8</sup>
Ensaio 2 (campo)	Fev- Mai/2019	Cindy <sup>1</sup> , Sarah <sup>1</sup> , Sharon <sup>1</sup> , Verona <sup>2</sup> , EACF 2000 <sup>3</sup> , Shiro <sup>4</sup> , Piracicaba de Verão <sup>5</sup> , Vera F1 <sup>6</sup> , Vigo F1 <sup>7</sup> , Champagne Snow <sup>8</sup> , Veridiana <sup>9</sup>

<sup>1</sup>Sakata Seed Sudamerica Ltda, <sup>2</sup>Seminis Vegetable Seeds INC, <sup>3</sup>Eagle Flores, Frutas & Hortaliças Eireli, <sup>4</sup>Takii do Brasil Ltda, <sup>5</sup> ISLA Sementes Ltda, <sup>6</sup>TopSeed Sementes Ltda;

<sup>7</sup>Bejo Sementes do Brasil Ltda; <sup>8</sup>Blue Seeds do Brasil Pesquisa, Desenvolvimento e Comércio Ltda, <sup>9</sup>Hortec Tecnologia de Sementes Ltda.

### 2.2.1 - Preparo das mudas

As sementes foram submetidas a um tratamento térmico (banho maria a 50° C por 30 minutos) e secas por um ventilador por cerca de 1 h a temperatura ambiente, visando garantir a sanidade inicial das sementes em relação ao patógeno alvo do estudo (Lopes e Quezado-Soares 1997). A semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno de 128 células contendo substrato comercial para hortaliças (Bio Plant Plus®) e um fertilizante de liberação lenta (Osmocote®), onde se colocou uma semente por célula. As bandejas, após a semeadura, foram mantidas em casa de vegetação, onde as mudas se desenvolveram até o ponto de plantio, três a quatro folhas verdadeiras.

### 2.2.2 - Delineamento experimental

Nos ensaios em casa de vegetação, o delineamento experimental foi em blocos ao acaso com três repetições, as parcelas consistiam em cinco plantas (uma planta/ vaso de 0,7 L). Em campo, o delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições. A parcela experimental foi constituída de 15 plantas, distribuídas em três linhas com cinco plantas. A parcela útil considerou apenas as cinco plantas da linha central, sendo as plantas das linhas laterais consideradas como bordadura. O espaçamento utilizado foi de 0,8 m entre linhas, 0,4 m entre plantas e 1,0 m entre blocos.

### 2.2.3 - Inoculação e avaliação da doença

As plantas foram desafiadas com o isolado de Xcc B-2015-51, originado de amostra de folhas de brócolis proveniente de lavoura do Distrito Federal. Em casa de vegetação, as

plantas foram inoculadas por meio de pulverização da suspensão bacteriana na concentração de aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> ( $A_{600nm} = 0,3$ ) em tampão de sulfato de magnésio na concentração de 10,15 mM L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> (Alphatec, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 246,48 g mol<sup>-1</sup>) adicionado de surfactante Tween 20/2L a aproximadamente 0,005% (v/v), com auxílio de um pulverizador manual de plástico com capacidade de 500 mL (Guarany®) até o ponto de escorrimento. Após a inoculação as plantas foram submetidas a condições de câmara úmida por 48 horas. Em campo, as plantas foram inoculadas concentração de aproximadamente  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> ( $A_{600nm} = 0,3$ ; diluída 1:10) com adição do surfactante Tween 20/2L a aproximadamente 0,005% (v/v), com auxílio de um pulverizador costal pressurizado por CO<sub>2</sub> (2,8 kgf cm<sup>2</sup>, munido de barra com dois bicos de jato plano TTI 110015, espaçados de 0,7 m, com consumo equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup>). As folhas foram molhadas até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, utilizou-se um regime de aspersão convencional intensivo (três irrigações diárias por até três dias após a inoculação).

A severidade da doença foi avaliada por atribuição de notas de acordo com níveis crescentes de severidade, para as cinco e dez folhas aparentemente mais atacada (IS) por planta, em casa de vegetação e campo, respectivamente, tendo como auxílio uma escala diagramática de notas (0 a 8) (Nuñez et al. 2017).

#### 2.2.4 - Análise dos dados

Os dados de desfolha e de produção foram submetidos à análise de variância e teste da Mínima Diferença Significante (LSD) a 5%, utilizando o programa computacional AgroEstat (Barbosa e Maldonado Júnior 2015). Os dados da variável nota de severidade, por serem ordinais (categóricos) foram utilizados para o cálculo de índices de severidade de acordo com a seguinte fórmula de acordo com McKinney (1923):

$$IS = \frac{\sum (\text{Número de plantas} \times \text{respectiva Nota}) \times 100}{\text{Total de plantas} \times \text{nota máxima}}$$

Os valores resultantes compuseram a seguinte variável: índice de severidade por folha (IS). Para severidade, também se avaliou o comprimento da lesão em centímetros (CLesão). As variáveis de produção avaliadas foram: (1) peso das inflorescências em gramas (PIF); (2) produtividade comercial em t ha<sup>-1</sup> (PDT); (3) relação entre os diâmetros - *ratio* (RLD) obtida a partir das medidas opostas, onde quanto mais próximo o valor de 1, mais circular e compacta é a inflorescência; (4) número total de folhas (NTF). Eles foram submetidos à análise de variância e teste da Mínima Diferença Significante (LSD) a 5%, utilizando o mesmo programa computacional.

#### 2.2.5 - Ensaio em casa de vegetação

A semeadura foi realizada em 22 de outubro de 2018 nas condições citadas em 2.2.1. As mudas foram plantadas em vasos de 0,7 L contendo a seguinte mistura: 9 kg de substrato comercial (Bio Planta Plus®, 10 kg de solo autoclavado e 150 g de fertilizante de liberação lenta, Osmocote®) aos 24 dias após a semeadura (DAS). As plantas foram inoculadas no estágio de 3-4 folhas verdadeiras, 12 dias após o plantio (DAP), a inoculação foi realizada nas condições citadas em 2.2.3. A severidade foi avaliada dez dias após a inoculação (DAI), atribuindo-se notas (0 a 8) para cinco folhas aparentemente mais atacadas (ISF) por planta com auxílio de uma escala diagramática (Nuñez et al. 2017).

#### 2.2.6 - Ensaio em campo

O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico (LVd) (Santos et al. 2013). Para o preparo da área, utilizou-se um subsolador, objetivando a descompactação do solo. Para facilitar o plantio e os tratos culturais, fez-se uso de um microtrator com enxada rotativa para nivelamento do solo. A implantação do ensaio foi precedida de uma análise de

solo, tendo sido coletadas dez subamostras na profundidade de 0 a 20 cm. Essas subamostras formaram uma amostra composta. Os resultados das análises químicas das amostras estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultado das análises de solo da área experimental – 2019. Brasília, DF, Brasil.

Ano	pH	MO	P*	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	H + Al <sup>3+</sup>	Al <sup>3+</sup>
		g dm <sup>-3</sup>	----- mg dm <sup>-3</sup> -----					cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----	
2019	5,7	40,4	127,5	302	10	2,4	1,1	6,7	0,0

\*Mehlich 1.

No ensaio, em campo, para a correção e adubação foram utilizados 3 t ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico com PRNT de 90%, 50 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 160 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e 150 kg ha<sup>-1</sup> de N. O nitrogênio foi parcelado em quatro vezes durante o ciclo da cultura (30 kg ha<sup>-1</sup> no plantio, 30 kg ha<sup>-1</sup> após o estabelecimento das mudas, 45 kg ha<sup>-1</sup> vinte dias após e 45 kg ha<sup>-1</sup> no início da formação da inflorescência), além de 5 kg de boro via solo e foliar.

A irrigação foi realizada por aspersão, com uma rega diária utilizando uma lâmina de 12 mm durante uma hora (Marouelli et al. 2017). As demais práticas culturais e controle fitossanitário foram realizados de acordo com o recomendado para a cultura (May et al. 2007).

A semeadura foi realizada em 22 de fevereiro de 2019, com o plantio de mudas aos 28 DAS. As mudas foram produzidas nas condições já citadas em 2.2.1. O espaçamento utilizado foi de 0,8 m entre linhas, 0,4 m entre plantas e 1,0 m entre blocos. As plantas foram inoculadas aos 26 (DAP) com uma suspensão bacteriana preparada como acima em 2.2.3. Para a aplicação do inóculo, as condições foram como as já descritas. Durante o período do experimento em campo, os dados meteorológicos registrados foram coletados em estação próxima ao local do experimento, apresentado pelas médias mensais (Tabela 3). Para o controle de pragas e



doenças foram utilizados inseticidas e fungicidas recomendados para a cultura, de acordo com a ocorrência do agente, inseto ou patógeno na área experimental, adotando-se a dose recomendada pelo fabricante. O controle de plantas invasoras foi feito com capina manual.

As colheitas foram realizadas em 13 de maio (28 DAI), 20 de maio (35 DAI) e 27 de maio (42 DAI). Nessa ocasião avaliou-se, além das variáveis de produção e a severidade da doença. A variável relacionada ao nível de doença foi IS. As variáveis de produção avaliadas foram: (1) peso das inflorescências em gramas (PIF); (2) produtividade comercial em t ha<sup>-1</sup> (PDT); (3) relação entre os diâmetros - *ratio* (RLD) obtida a partir das medidas opostas, onde quanto mais próximo o valor de 1, mais circular é a inflorescência; (4) número total de folhas (NTF).

**Tabela 3.** Médias de precipitação, temperatura e umidade obtidas na estação agrometeorológica da Embrapa Hortaliças – 2019. Brasília, DF, Brasil.

Mês	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)		Umidade (%)	
		Máx.	Mín.	Máx.	Mín.
Fevereiro	269,2	29,5	18,3	82,9	45,4
Março	140,8	28,7	18,4	78,3	49,1
Abril	211,2	28,6	17,6	81,7	48,3
Maiο	80,8	28,3	15,8	71,7	42,0
Junho	0	26,8	13,1	65,4	35,7

### 2.3 - Avaliação da estabilidade da resistência de híbridos comerciais de couve-flor para Xcc

Em casa de vegetação (setembro/2020 a outubro/2020) foi conduzido um ensaio para avaliar a estabilidade da resistência de híbridos comerciais de couve-flor frente a Xcc, em esquema fatorial inteiramente casualizado, com quatro repetições e parcela de duas folhas de uma planta. Foram utilizadas duas cultivares, sendo escolhidas por serem mais

comercializadas nas regiões centro-oeste e nordeste. As mudas foram produzidas nas condições já citadas. Os fatores foram: Fator A. Isolados, definidos de acordo com os haplótipos que foram isolados de plantas de couve-flor (Tabela 5); Fator B. Cultivares (Cindy; Sarah) e Fator C. método de inoculação (pulverização e ferimento na folha com uma pinça dentada “mouse tooth”). A inoculação por pulverização foi realizada como descrito para a avaliação dos genótipos em casa de vegetação. Já para a inoculação por pinça foi realizada por perfuração nas bordas das folhas, entre as nervuras, utilizando uma pinça dentada (“mouse tooth”) envolta com um chumaço de algodão embebido em suspensão bacteriana na concentração já citada, em duas folhas, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas. As plantas foram avaliadas aos dez (DAI), onde avaliou-se a severidade da doença medindo se o comprimento da lesão em duas folhas com auxílio de um paquímetro.

**Tabela 4.** Dados dos isolados utilizados no ensaio de estabilidade da resistência de híbridos comerciais de couve-flor.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Haplótipo BOX-PCR <sup>1</sup>
B-2014-5	Couve-flor	Pinhalzinho-SP	H13
B-2014-7	Couve-flor	Núcleo Rural Vargem Bonita-DF	H12
B-2015-42	Couve-flor	Brazlândia-DF	H6
B-2015-43	Couve-flor	Munhoz-MG	H40
B-2015-64	Couve-flor	N. R. Vargem Bonita-DF	H62
B-2017-65	Couve-flor	São Sebastião do Paraíso-MG	H22
B-2018-84	Couve-flor	N. R. Vargem Bonita-DF	H25
B-2018-124	Couve-flor	Padre Bernardo-GO	H50
B-2018-125	Couve-flor	Padre Bernardo-GO	H51
B-2018-137	Couve-flor	N. R. Taquara-DF	H26

<sup>1</sup> Haplótipos obtidos por meio da análise de BOX-PCR (Louws et al, 1994).

### 3 - Resultados

#### 3.1- Ensaio em casa de vegetação

Foram detectadas diferenças significativas entre as cultivares no ensaio conduzido em casa de vegetação. Quanto ao no primeiro ensaio o híbrido EACF 2000 apresentou a menor severidade, e não se diferindo apenas de Champagne Snow (Tabela 5).

**Tabela 5.** Índices de severidade na folha mais atacada por planta (IS), no ensaio de cultivares de couve-flor em casa de vegetação, de acordo com escalas de notas, 2018. Brasília, DF, Brasil.

Cultivares <sup>1</sup>	IS (%)
Shiro	56,00 ab
Verona	49,33 ab
Sharon	52,00 ab
Cindy	49,33 ab
Sarah	64,00 a
EACF 2000	24,00 c
Piracicaba de Verão	58,67 a
Vigo F1	57,33 a
Vera F1	53,33 ab
Champagne Snow	34,67 bc
C.V (%)	26,46

<sup>1</sup> A cultivar Piracicaba de Verão é uma cultivar de polinização aberta. \* Médias seguidas de mesma letra nas colunas diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Student, a 5% de probabilidade.

#### 3.2 - Ensaio em campo

Foram detectadas diferenças significativas entre as cultivares no ensaio conduzido quanto ao índice de severidade por folha (IS%) (Tabela 6). Porém, houve menor distinção entre as cultivares, notada apenas entre os extremos de severidade. A cultivar que teve o

maior índice de severidade foi Cindy (44,25%) diferiu-se, apenas de Piracicaba de Verão (33,62%). Em relação às características comerciais e produtividade, as cultivares não foram muito distintas, apresentando em geral bom padrão de comercialização quanto à relação de diâmetros da cabeça, com a cultivar EACF 2000 (0,96) com uma menor relação entre os diâmetros, diferindo-se de Sarah (1,05) e Cindy (1,04) que tiveram a maior relação; e peso da cabeça, com a cultivar Vera F1 (628,50 g) diferindo-se de Piracicaba de Verão (396,55 g). Foi detectada diferença entre Piracicaba de Verão (12 t ha<sup>-1</sup>) e Vera F1 (19 t ha<sup>-1</sup>) (Tabela 7). Quanto ao número total de folhas, as cultivares Sharon (20,20) e Verona (19,50), também tiveram o maior número total de folhas diferindo-se de Veridiana (13,55) que teve o menor número total de folhas (Tabela 7).

**Tabela 6.** Índices de severidade na folha mais atacada por planta (IS), no ensaio de cultivares de couve-flor em campo, de acordo com escalas de notas, 2019. Brasília, DF, Brasil.

Cultivares <sup>1</sup>	IS (%)
EACF 2000	41,87 ab
Sarah	36,37 ab
Verona	41,00 ab
Sharon	40,43 ab
Cindy	44,25 a
Veridiana	40,75 ab
Shiro	41,37 ab
Vera F1	37,71 ab
Vigo F1	34,75 ab
Piracicaba de Verão	33,62 b
Champagne Snow	42,50 ab
C.V (%)	24,49

<sup>1</sup> A cultivar Piracicaba de Verão é uma cultivar de polinização aberta. \* Médias seguidas de mesma letra nas colunas diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Student, a 5% de probabilidade.

**Tabela 7.** Relação entre diâmetros (ratio) (RDIF), número total de folhas (NTFOLHAS), peso da inflorescência (PIF) e produtividade das cultivares e híbridos de couve-flor em ensaio de campo, 2019. Brasília, DF, Brasil..

Cultivares <sup>1</sup>	RDIF	NTFOLHAS	PIF (g)	PRODUT (t ha <sup>-1</sup> )
EACF 2000	1,03 b	16,75 b	479,90 bcd	15,00 bcd
Sarah	1,06 ab	15,70 bc	408,35 cd	12,76 cd
Verona	1,04 ab	19,50 a	549,95 ab	17,18 ab
Sharon	1,06 ab	20,20 a	494,95 bcd	15,46 bcd
Cindy	1,03 ab	14,25 cde	442,05 bcd	13,81 bcd
Veridiana	1,04 ab	13,55 e	548,95 ab	17,15 ab
Shiro	1,04 ab	16,00 bc	399,50 cd	12,48 cd
Vera F1	1,04 ab	13,70 de	628,50 a	19,64 a
Vigo F1	1,11 a	15,55 bcd	421,85 bcd	13,18 bcd
Piracicaba de Verão	1,05 ab	14,15 cde	386,55 d	12,08 d
Champagne Snow	1,01 b	16,65 b	524,00 abc	16,37 abc
C.V (%)	4,97	8,62	18,90	18,91

<sup>1</sup> A cultivar Piracicaba de Verão é de polinização aberta. \* Médias seguidas de mesma letra nas colunas diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Student, a 5% de probabilidade.

### 3.3 - Avaliação da estabilidade da resistência de híbridos comerciais de couve-flor para Xcc

Apesar dos resultados de avaliação de cultivares não terem sido conclusivos, escolheu-se as cultivares Cindy e Sarah para a avaliação com um grupo de isolados de haplótipos mais frequentes encontrados nas lavouras de couve-flor, de acordo com os resultados obtidos no estudo de variabilidade (capítulo 2). Apesar de indistintas nesses ensaios, no ensaio de estabilidade, para a variável índice de severidade (CLesão) foram significativos os efeitos de cultivar ( $P = 0,01$ ), efeitos de isolado ( $P < 0,0001$ ) e efeito de método de inoculação ( $P < 0,0001$ ), tendo sido significativo o efeito da interação cultivar x isolado ( $P = 0,02$ ), da interação isolado x método de inoculação ( $P < 0,0001$ ), e não tendo sido significativo a interação cultivar x método de inoculação ( $P = 0,24$ ) e a interação cultivar x isolado x

inoculação ( $P = 0,08$ ). Assim, tomando o conjunto de isolados como um todo a cultivar Sarah apresentou menor severidade do que a cultivar Cindy (Tabela 8 e 9).

**Tabela 8.** Comprimento (cm) da lesão foliar (CLesao) por isolado e cultivar nas folhas inoculadas de híbridos de couve-flor em casa de vegetação, 2020. Brasília, DF, Brasil.

Isolado	Cindy	Sarah
B-2014-5	2,39 a* A	1,58 b B
B-2014-7	1,33 b A	1,23 bc A
B-2015-42	2,15 a A	1,67 ab A
B-2015-43	1,29 b A	0,49 d B
B-2015-64	0,61 cd A	0,70 cd A
B-2017-65	0,66 cd A	0,60 d A
B-2018-84	0,57 d A	0,72 cd A
B-2018-124	2,50 a A	1,98 a A
B-2018-125	1,11 bc A	1,26 b A
B-2018-137	1,32 b A	1,58 ab A
C. V (%)	14,68	-

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Student, a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados ( $\sqrt{x + 0,5}$ ).

**Tabela 9.** Comprimento (cm) da lesão foliar (CLesao) por isolado e método de inoculação, nas folhas inoculadas de híbridos de couve-flor em casa de vegetação, 2020. Brasília, DF, Brasil.

Isolado	Pinça	Pulverização
B-2014-5	2,14 a A*	1,83 a A
B-2014-7	1,36 c A	1,20 b A
B-2015-42	1,96 ab A	1,85 a A
B-2015-43	1,10 c A	0,68 bc A
B-2015-64	1,31 c A	0,00 d B
B-2017-65	1,26 c A	0,00 d B
B-2018-84	1,28 c A	0,00 d A
B-2018-124	2,25 a A	2,23 a A
B-2018-125	1,55 bc A	0,83 bc B
B-2018-137	2,27 a A	0,64 c B
C. V (%)	14,68	-

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Student, a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados ( $\sqrt[2]{x + 0,5}$ ).

#### 4 - Discussão

A podridão negra é uma doença muito importante para a cultura da couve-flor. No presente estudo não se encontrou nenhuma cultivar comercial que foi altamente resistente ao patógeno, em consonância a diversos estudos anteriores com couve-flor e outras brássicas, como o repolho (Henz e Melo, 1994) e o brócolis (Seabra Junior et al., 2007). Santos et al. (2008) analisando a reação de quatro cultivares de couve-flor em casa de vegetação, observaram que nenhuma cultivar era resistente a podridão negra, sendo as Bola de neve e Piracicaba de Verão sendo consideradas altamente suscetível. No mesmo estudo, as cultivares Piracicaba precoce e Cindy foram consideradas medianamente resistentes. Já Morais Junior et al. (2012), em seus estudos com seis genótipos de couve-flor, verificou que as cultivares

Verona e Piracicaba de Verão foram consideradas resistentes à podridão negra em condições de campo. Silva et al. (2015) estudando seis genótipos de couve-flor avaliaram que a cultivar Verona foi o genótipo mais resistente nos dois anos que o estudo foi conduzido, porém no presente trabalho a cultivar Verona foi uma das mais suscetíveis em condições de campo, divergindo do resultado encontrado por Moraes Junior et al. (2012) e de Silva et al. (2015). No entanto, as cultivares Sarah e Sharon foram suscetíveis, o mesmo resultado encontrado nos estudos de Moraes Junior et al. (2012) e de Silva et al. (2015). Um fator que pode afetar o comportamento das cultivares nos dois ambientes (casa de vegetação e campo) e, estágios de desenvolvimento, é a arquitetura da planta relacionada à inclinação das folhas. Acredita-se que em campo, haverá menor ou maior acúmulo de água sobre a superfície das folhas, que favorece as doenças bacterianas foliares em geral, de acordo com essa característica intrínseca de cada genótipo. Sharma et al. (1991) estudando a cinco cultivares com diferentes tipos de arquitetura, observaram que não houve correlação entre arquitetura, incidência e severidade da doença, as duas cultivares que tiveram melhor desempenho frente a doença foram de porte semi ereto e de porte prostado.

Apesar da resistência genética ser o importante para o controle das doenças bacterianas, outras variáveis estão envolvidas na indicação da cultivar ideal para a região de estudo. As variáveis de produção têm um aspecto importante nos estudos de reação de genótipos, nos estudos de Moraes Junior et al. (2012) e Silva et al. (2015), apesar de a cultivar Cindy não apresentar alta resistência a podridão negra, se destacou como o genótipo mais produtivo, nesses estudos. Jiang et al. (2011) relataram que não apenas os genótipos resistentes possuem mecanismos de resposta de defesa, mas os suscetíveis também. Assim, o termo tolerante é o mais apropriado para as cultivares que mantém a produtividade apesar da doença (Jiang et al. 2011). Os genótipos que podem ser classificados como tolerantes no presente estudo são Vera F1 (19,64 t ha<sup>1</sup>), Verona (17,18 t ha<sup>1</sup>) e Veridiana (17,15 t ha<sup>1</sup>).



Para a variável produtividade, considerando a média de 15,47 t ha<sup>1</sup> encontrada por Castoldi et al. (2009), os genótipos avaliados tiveram valores de produtividades entre 15,20 e 21,57 t ha<sup>1</sup> (2018) e 12,08 e 19,64 t ha<sup>1</sup> (2019) no presente estudo. A produtividade potencial para couve-flor varia de 15 a 25 t ha<sup>1</sup> (May et al. 2007). Fatores bióticos e abióticos também contribuem de forma decisiva para o incremento de produtividade em couve-flor por interferir fisiologicamente nos seus estádios de desenvolvimento.

A interação genótipo com o ambiente demonstra o comportamento diferencial dos genótipos em função da diversidade ambiental, como se sabe, um genótipo pode ter um desempenho inferior de acordo com as condições ambientais da época de cultivo (Annicchiarico, 2002). Nesse contexto, os genótipos estudados, nos dois anos de cultivos, tiveram desempenhos diferentes com relação aos dados de produção e severidade.

No presente estudo, todas as cultivares tiveram valores acima de 0,88 para a relação entre os diâmetros da inflorescência. Em couve-flor, um dos parâmetros buscado na qualidade comercial de sua inflorescência é sua compacidade, ou seja, onde observa-se os floretes ainda unidos e mantendo a uniformidade da inflorescência. A RDIF é a razão entre o diâmetro transversal com o longitudinal onde o resultado expresso deve ser próximo a 1 o que mostra que a compacidade da cabeça é praticamente perfeita onde assume-se um círculo perfeito. Segundo Caixeta et al. (2000) valores acima de 0,88 são aceitáveis para todos os cultivares.

Em relação ao número total de folhas, as cultivares Sharon (22,35) e Verona (21,90) apresentaram as maiores médias. Em estudo anterior, o número total de folhas para a cultivar Verona foi de em média de 25 folhas (Castoldi et al. 2009). O melhoramento genético tem procurado melhorar o potencial produtivo de diversas culturas, levando em consideração seu ideótipo. Com o aumento do número de folhas, pode-se obter um aumento no índice de área foliar, resultando em maior capacidade fotossintética, desde que se considere um ângulo de

inserção das folhas superiores do tipo ereto (May et al. 2007). Ao longo dos anos, o melhoramento da couve-flor foi direcionado para genótipos com folhas grandes e maior número de folhas. Além disso, segundo os autores, plantas com folhas maiores podem tolerar melhor o dano causado pelo patógeno. Assumindo que a doença avança na mesma velocidade em todas as folhas, o patógeno invadirá uma folha com uma superfície menor em menos tempo que uma folha com uma maior. Plantas com folhas maiores poderiam deter a expansão da clorose, mantendo parte da folha fotossinteticamente ativa (Iglesias-Barnabé et al. 2019).

Quanto as diferenças aos métodos de inoculação, alguns isolados não induziram doença quando pulverizados, e apresentaram menor severidade da doença por esse método de inoculação. Respostas variáveis em brássicas também foram registrados quando diferentes métodos de inoculação são usados (Vicente et al, 2006; Fargier e Manceau 2007). Depois da inoculação por pulverização, é comum que as folhas fiquem cobertas com pequenas manchas escuras no limbo que eventualmente evoluem para os típicos sintomas de podridão negra. Por outro lado, os sintomas aparecem mais rapidamente e são mais óbvios após a inoculação por ferimento nas folhas (Cruz et al. 2017).

A herança genética para a resistência a podridão negra tem sido amplamente estudada, até o presente momento nenhum gene de resistência foi identificado (Vicente e Holub 2013). Embora a resistência das cultivares a Xcc seja o método de controle mais eficaz para o controle da doença em couve-flor, na prática, o sucesso é limitado porque as cultivares estudadas não apresentaram resistência. O uso de cultivares mais tolerantes, combinado com o tratamento de sementes, rotação de culturas e a utilização de agrotóxicos eficazes devem ser consideradas como melhor manejo para a podridão negra em couve-flor.

## 5 - Conclusão

Os programas de melhoramento de brássicas ainda têm um longo caminho a percorrer para desenvolver genótipos altamente resistentes a Xcc, pois poucas fontes de resistência foram relatadas em *B. oleracea*, e a maioria dessas fontes não são cultivadas comercialmente. Em couve-flor, o fato de o produto comercial ser a inflorescência e a doença afetar negativamente a aparência das folhas, genótipos intermediários podem ser indicados para o produtor. Sendo assim, as cultivares Verona, Veridiana e Vera F1, por terem mostrado reação intermediária à podridão negra e terem mantido os padrões de produtividade nos ensaios de campo, podem ser recomendadas para o cultivo no período de verão-outono no Distrito Federal.

## 6 - Referências Bibliográficas

---

- Afrin KS, Rahim MA, Park JI, Natarajan S, Kim HT, Nou IS (2018) Identification of NBS-encoding genes linked to black rot resistance in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Molecular Biology Report* 45: 773–785.
- Annicchiarico P. (2002) Genotype × environment interaction: challenges and opportunities for plant breeding and cultivar recommendations. Rome: FAO.
- Arias RS, Nelson SC, Alvarez AM (2000) Effect of soil-matric potential and phylloplanes of rotation-crops on the survival of a bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *European Journal Plant Pathology* 106: 109–116.
- Barbosa JC, Maldonado Junior W (2015) AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Jaboticabal, FCAV/UNESP. p.396
- Caixeta CC, Tenório FEP, Leme JA, Maluf WR (2000) Classifique e aumente o seu lucro. Lavras. *Boletim Técnico de Hortaliças* n. 47.
- Castoldi R, Charlo HCO, Vargas PF, Braz LT (2009) Crescimento, acúmulo de nutrientes e produtividade da cultura da couve-flor. *Horticultura Brasileira* 27: 438-446.
- Cruz J, Tenreiro R, Cruz L (2017) Assessment of diversity of *Xanthomonas campestris* pathovars affecting cruciferous plants in Portugal and disclosure of two novel *X. campestris* pv. *campestris* races. *Journal of Plant Pathology* 99: 403–414.
- FAO. FAOSTAT – Agricultural statistics database. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014.
- Fargier E, Manceau C (2007) Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 56: 805–818.
- Gregory EW (2015) Vegetable production and practices. CABI 10 pp.
- Gu H, Wang J, Zhao Z, Sheng X, Yu H, Huang W (2014) Characterization of the appearance, health-promoting compounds, and antioxidant capacity of the florets of the loose-curd cauli flower. *International Journal Food Properties* 18: 392-402.

- Henz GP e Melo PE (1994) Resistência de cultivares de repolho à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Pesquisa. Agropecuária. Brasileira 29: 411-415.
- Iglesias-Bernabé L, Madloo P, Rodríguez VM, Francisco M, Soengas P (2019) Dissecting quantitative resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in leaves of *Brassica oleracea* by QTL analysis. Scientific reports 9: 1-11.
- Jiang H, Song W, Yang ALX, Sun D (2011) Identification of genes differentially expressed in cauliflower associated with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Molecular Biology Reports 38: 621-629.
- Koppen W, Geiger R (1928) Klimate der Erde. Gotha: Verlag Justus Perthes, 1928
- Lopes CA, Quezado-Soares AM (1997) Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQ; EMBRAPA-SPI. pp. 70.
- Maringoni AC (2005) Doenças de crucíferas. In: Kimati, H (Ed.) Manual de Fitopatologia: Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo, Brasil. Agronômica Ceres. pp. 285-291.
- Marouelli WA, MELO RDC, Braga MB (2017) Irrigação no cultivo de brássicas. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E).
- May A, Tivelli S, Vargas PF, Sanra AG, Sacconi LV, Pinheiro MQ (2007) A cultura da couve-flor. Campinas: Instituto Agronômico. (Boletim técnico 200).
- McKinney HH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research 26: 195-217
- Melo RA, Vendrame LP, Madeira NR, Blind AD, Vilela NJ (2019) Characterization of the Brazilian vegetable brassicas production chain. Horticultura Brasileira 37: 366-372.
- Morais Júnior O, Cardoso A F, Leão E F, Peixoto N (2012) Desempenho de cultivares de couve-flor de verão em Ipameri. Ciência. Rural 42: 1923-1928.
- Núñez AMP, Monteiro FP, Pacheco LP, Rodriguez GAA, Nogueira CCA, Pinto FAMF, Medeiros FHV de, Souza JT de (2016) Development and Validation of a Diagrammatic

- Scale to Assess the Severity of Black Rot of Crucifers in Kale. *Journal of Phytopathology* 165: 195-203.
- Peruch LA, Michereff SJ, Araújo IB (2006) Levantamento da intensidade da alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. *Horticultura Brasileira* 24: 464-469.
- Ribeiro LMP, Zanuzo MAR, Vieira CVI, Junior SS, Junior FF (2017) Cauliflower quality and yield under tropical conditions are influenced by boron fertilization. *African Journal of Agricultural Research*, 12: 1045-1053.
- Roberts SJ, Brough J, Hunter PJ (2007) Modelling the spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in modularised Brassica transplants. *Plant Pathology* 56: 391–401.
- Santos HG dos, Jacomine PKT, Anjos LHC dos, Oliveira VA de, Lumbreras JF, Coelho MR, Almeida JA de, Cunha TJF, Oliveira JB de (Ed) (2013) Sistema brasileiro de classificação de solos. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa. pp.353
- Santos LA, Bandeira DA, Silva JP, Silveira EB, Gomes AMA, Mariano RLR (2008) Caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* de sistemas de produção orgânico e reação de brássicas à podridão-negra. *Horticultura Brasileira* 26:486-491.
- Seabra Júnior S, Paixão GS, Maringoni AC, Goto R, Camara RC (2008) Reação de híbridos de brócolis ‘tipo cabeça única’ à podridão negra. *Summa Phytopathologica* 34: 76-77.
- Sharma BR, Dhiman JS, Thakur JC, Singh A, Bajaj KL (1991) Multiple disease resistance in cauliflower. *Advances in Horticultural Science*: 30-34.
- Silva Júnior TAF, Silva JC, Gonçalves RM, Soman JM, Passos JRS, Maringoni AC (2020) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. *European Journal of Plant Pathology* 156:399–411.
- Singh BK, Singh B, Singh PM (2018) Breeding cauliflower: A review. *International Journal of Vegetable Science* 24: 58-84.

- Vicente JG, Everett B, Roberts SJ (2006) Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. *Phytopathology* 96: 735-745.
- Vicente JG, Holub EB (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* 14:2–18.
- Villeth GR, Reis Junior FB, Tonietto A, Huergo L, Souza EM, Pedrosa FO, Franco OL, Mehta A (2009) Comparative proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the susceptible and the resistant cultivars of *Brassica oleracea*. *FEMS Microbiology Letters* 298: 260-266.

# Capítulo 4

---

---

**Avaliação de programas de integração e produtos de proteção para o controle da podridão negra**



## **Avaliação de programas de integração e produtos de proteção para o controle da podridão negra**

### **Resumo**

A podridão negra [*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc)] é uma das principais doenças que causam prejuízos na cultura da couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Uma das principais práticas de manejo é a utilização de agrotóxicos. O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação e integração desses agrotóxicos disponíveis para uso em couve-flor para o controle da podridão negra em condições de campo e casa de vegetação. Assim, instalou-se um ensaio em campo experimental e um em casa de vegetação, nos anos 2019 e 2020, respectivamente. No ensaio de campo avaliou-se as seguintes variáveis: relação entre diâmetros (*ratio*), número total de folhas, peso da inflorescência, produtividade das cultivares e severidade. Em casa de vegetação avaliou a severidade da doença por meio de uma escala de notas, comprimento da lesão e pontos de infecção. Os agrotóxicos avaliados foram: azoxistrobina e difenoconazol, óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; trifloxistrobina e tebuconazol; oxicloreto de cobre e mancozebe; *Bacillus subtilis* linhagem Y1336; casugamicina. Em condições de campo nenhum programa de integração teve efeito na severidade da doença. Além disso, observou-se efeitos dos programas de integração no peso da inflorescência e produtividade. Em casa de vegetação, o agrotóxico à base de *Bacillus subtilis* reduziu a severidade da podridão negra em couve-flor quando aplicado via foliar. Sendo assim, essa modalidade de aplicação deve ser avaliada em campo com vistas à sugestão de modificação da bula para a inclusão do alvo e respectiva modalidade de aplicação e dessa forma, disponibilizar alternativa de controle dessa importante doença ao produtor.

**Palavras-chaves:** *Brassica oleracea* var. *botrytis*, controle biológico, controle químico manejo integrado, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

## Abstract

Black rot [*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc)] is one of the main diseases that cause damage to the cauliflower crop (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). One of the main management practices is the use of phytosanitary products. This study aims to evaluate the action and integration of these products available for use in cauliflower to control black rot in field and greenhouse conditions. Thus, a trial in an experimental field and a greenhouse was installed in the years 2019 and 2020, with a randomized block design with three replications (greenhouse) and four replications in the field. Where the severity of the disease was assessed using a scale of scores, length of the lesion and points of infection in the greenhouse. And the following variables: relationship between diameters (ratio), total number of leaves, weight of inflorescence, yield of cultivars and severity for the field trial. The pesticides evaluated were: azoxystrobin and difenoconazole, essential oil of *Melaleuca alternifolia*; trifloxystrobin and tebuconazole; copper oxychloride and mancozebe; *Bacillus subtilis* strain Y1336; casugamycin. Under field conditions, no integration program influenced the severity of the disease. In addition, the effects of integration programs on the weight of inflorescence and productivity were observed. In a greenhouse, the product based on *Bacillus subtilis* reduced the severity of black rot in cauliflower when applied via leaf. Thus, few pesticides managed to reduce the severity of black rot in cauliflower.

**Keywords:** *Brassica oleracea* var. *botrytis*, biological control, chemical control, integrated management, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

## 1 - Introdução

A couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) teve seu consumo aumentado devido, principalmente, ao seu reconhecimento como alimento funcional, o que refletiu em crescimento significativo de mercado para essa cultura, tornando a produção ainda mais crescente nos anos seguintes (Abul-Fadl 2012). Essa cultura é considerada de grande importância para agricultura familiar, com rápido retorno monetário para os produtores e com grandes volumes de produção em diversos estados brasileiros (Melo et al. 2019).

Nesse contexto, a produção brasileira se concentra nas regiões Sudeste e Sul, com os estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Paraná sendo responsáveis por 86% do total comercializado nas Ceasas (ProHort 2018). No Brasil, a produtividade média se encontra em 20 t ha<sup>-1</sup> (Melo et al. 2019). A cultura da couve-flor é acometida por diferentes pragas e doenças que diminuem a qualidade e produtividade, dentre elas, a podridão negra das brássicas é a mais comum (Peruch et al. 2006).

A podridão negra tem como agente causal *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (Pammel) Dowson, uma bactéria aeróbia, gram-negativa e capaz de produzir polissacarídeo extracelular (goma xantana) (Aires et al. 2011). A doença é transmitida pela semente, mudas infectadas, restos de colheita e solo (Silva Junior et al. 2020). A bactéria entra nos tecidos da planta através dos hidatódios nas margens das folhas por reabsorção das gotas de gutação na folha, coloniza os espaços intercelulares e se movem através do sistema vascular, produzindo goma xantana que obstrui os vasos do xilema e restringe o fluxo de água, resultando em lesões cloróticas em forma de “V”. A doença é denominada podridão negra devido ao escurecimento dos vasos, resultante do movimento do patógeno através do tecido vascular (Vicente e Holub 2013).

O manejo da doença, geralmente, inclui o uso de material de plantio saudável e certificado (sementes e mudas), rotação de culturas, eliminação de outras fontes potenciais de

inóculo (restos de culturas infectadas e plantas daninhas) e uso de cultivares resistentes, mas esses métodos mostraram apenas um sucesso limitado na prática (Taylor et al. 2002). A atividade antibacteriana do cobre está bem estabelecida e o uso de compostos de cobre para tratar doenças de plantas bacterianas tornou-se padrão no início dos anos 1900 (Clark e Stephen 1905). Porém, o uso sistemático de compostos de cobre levou ao aparecimento de isolados de Xcc resistentes (Voloudakis et al. 2005; Lugo et al. 2013).

Com a descoberta dos antibióticos nas décadas de 1950 e 60, essas moléculas mostraram-se uma excelente ferramenta química para o controle de diversas doenças bacterianas de plantas (Dunegan et al. 1954; Umezawa et al. 1965). Apesar do seu sucesso, a resistência aos antibióticos em bactérias fitopatogênicas começou a aparecer, alguns anos após a introdução do uso destes agrotóxicos (Moller et al. 1981). Portanto, tem se buscado formas alternativas de controle da podridão negra.

O controle biológico surge como uma alternativa para o controle desta doença. Para isso utiliza-se de microrganismos benéficos e/ou de seus metabólitos para o controle de diferentes patógenos por vários mecanismos que incluem competição por nutrientes e espaço, antibiose, resistência induzida ou parasitismo. Além disso, diversos microrganismos antagonistas utilizados para o controle biológico de fitopatógenos apresentam a capacidade de promover o crescimento vegetal e induzir seus mecanismos de defesa contra patógeno (Perez-Garcia et al. 2011). Dentre esses microrganismos estão as bactérias do gênero *Bacillus* que tem a capacidade de produzir amplo espectro de antibióticos e outros metabólitos com atividade antagônica contra fitopatógenos (Zhao et al. 2018). As espécies de *Bacillus* são comumente encontradas no solo, rizosfera e filosfera. Bactérias desse gênero são conhecidas por promover o crescimento de plantas e têm demonstrado capacidade de colonizar plantas endofiticamente, o que é uma característica importante para o biocontrole de patógenos

vasculares (Monteiro et al. 2005). Entre as espécies de *Bacillus*, as mais comumente utilizadas são *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilis* (Wulff et al. 2002).

De forma mais ampla, o uso de produtos naturais extraídos ou fermentados de várias fontes também pode ser considerado como controle biológico. O uso de extratos de plantas e óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana contra vários isolados de Xcc (Iacobellis et al. 2005; Vigo-Schultz et al. 2006; Da Silva et al. 2019; Da Silva et al. 2020).

Há um número reduzido de agrotóxicos registrados para o uso em hortaliças (Cruz 2013). Os ingredientes ativos (i. a.) que têm registro para utilização na cultura da couve-flor são: azoxistrobina, *Bacillus subtilis* linhagem Y1336, mancozebe e oxicloreto de cobre, casugamicina, tebuconazol e trifloxistrobina, óleo de casca de laranja, *Bacillus subtilis* linhagem QST 713, *Bacillus pumilus* linhagem QST 2808, óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 (Brasil 2020), mas somente *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 tem como patógeno alvo Xcc.

Diante do exposto acima, o objetivo deste estudo foi avaliar programas de integração de agrotóxicos registrados para a couve-flor que tenham ativos com potencial para o controle de bacterioses, visando a redução da severidade da podridão negra. Investigou-se ainda, o efeito isolado de cada produto em condições de casa de vegetação.

## **2 - Material e métodos**

### **2.1 - Localização da área experimental**

Os ensaios foram conduzidos em campo experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças), em Brasília, DF, situada nas seguintes coordenadas geográficas 15°56'00" latitude Sul, 48°08'00" latitude Oeste e com altitude em relação ao nível do mar de 997 metros. O clima predominante na região é o clima tropical com estação seca, sendo classificado por Koppen-Geiger como Aw, com épocas secas bem definidas,

caracterizado pela presença de duas estações: chuvosa (entre outubro a abril) e outra seca (de maio a setembro).

## 2.2 – Instalação e condução dos ensaios de avaliação de produtos de proteção fitossanitária

Foram conduzidos dois ensaios, sendo um em campo e um em casa de vegetação. As cultivares utilizadas foram: Cindy (Sakata Seed) e EACF 2000 (Eagle Flores, Frutas e Hortaliças EIRELI) para campo. Cindy (Sakata Seed Sudamerica Ltda) para casa de vegetação.

### 2.2.1 – Preparo das mudas

As sementes foram submetidas a um tratamento térmico (banho maria a 50° C por 30 minutos) e secas por um ventilador por cerca de 1 h a temperatura ambiente, visando garantir a sanidade inicial das sementes em relação ao patógeno alvo do estudo (Lopes e Quezado-Soares 1997). A semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno de 128 células contendo substrato comercial para hortaliças (Bio Plant Plus®) e um fertilizante de liberação lenta (Osmocote®), onde se colocou uma semente por célula. As bandejas, após a semeadura, foram mantidas em casa de vegetação, onde as mudas se desenvolveram até o ponto de plantio.

### 2.2.2 – Delineamento experimental

No ensaio em campo, o delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições e nove tratamentos. A parcela experimental foi constituída de 15 plantas, distribuídas em três linhas com cinco plantas. A parcela útil considerou apenas as cinco plantas da linha central, sendo as plantas das linhas laterais consideradas como bordadura. O espaçamento utilizado foi de 0,8 m entre linhas, 0,4 m entre plantas e 1,0 m entre blocos. Em

casa de vegetação, o delineamento experimental foi em blocos ao acaso com três repetições e sete tratamentos, as parcelas consistiam em cinco plantas (uma planta/ vaso de 0,7L).

### 2.2.3 - Inoculação e avaliação da doença

As plantas foram desafiadas com o isolado de Xcc B-2015-51, originado de amostra de folhas de brócolis proveniente de lavoura do Distrito Federal. Em casa de vegetação, as plantas foram inoculadas por meio de pulverização da suspensão bacteriana na concentração de aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> ( $A_{600nm} = 0,3$ ) em tampão de sulfato de magnésio na concentração de 10,15 mM L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> (Alphatec, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 246,48 g mol<sup>-1</sup>) adicionado de surfactante Tween 20/2L a aproximadamente 0,005% (v/v), com auxílio de um pulverizador manual de plástico com capacidade de 500 mL (Guarany®) até o ponto de escorrimento. Após a inoculação as plantas foram submetidas a condições de câmara úmida por 48 horas. Em campo, as plantas foram inoculadas concentração de aproximadamente  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> ( $A_{600nm} = 0,3$ ; diluída 1:10) com adição do surfactante Tween 20/2L a aproximadamente 0,005% (v/v), com auxílio de um pulverizador costal pressurizado por Co<sub>2</sub> (2,8 kgf cm<sup>2</sup>, munido de barra com dois bicos de jato plano TTI 110015, espaçados de 0,7 m, com consumo equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup>). As folhas foram molhadas até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, utilizou-se um regime de aspersão convencional intensivo (três irrigações diárias por até três dias após a inoculação).

A severidade da doença foi avaliada por atribuição de notas de acordo com níveis crescentes de severidade, para as três folhas aparentemente mais atacada (IS) por planta, em casa de vegetação, respectivamente, tendo como auxílio uma escala diagramática de notas (0 a 8) (Nuñez et al. 2017). Também se avaliou a severidade por comprimento da lesão (CLesão) em centímetros, com auxílio de um paquímetro e se contou o número de pontos de infecção

ao longo da borda da folha inoculada (PI), em casa de vegetação. Em campo, a severidade da doença foi avaliada pela incidência de folhas com sintomas (INC)

#### 2.2.4 – Análise de dados

Os dados de desfolha e de produção foram submetidos à análise de variância e teste da Mínima Diferença Significante (LSD) a 5%, utilizando o programa computacional AgroEstat (Barbosa e Maldonado Júnior 2015). Os dados da variável nota de severidade, por serem ordinais (categóricos) foram utilizados para o cálculo de índices de severidade de acordo com a seguinte fórmula McKinney (1923):

$$IS = \frac{\sum (\text{Número de plantas} \times \text{respectiva Nota}) \times 100}{\text{Total de plantas} \times \text{nota máxima}}$$

Os valores resultantes compuseram a seguinte variável: índice de severidade por folha (IS). Para severidade, também se avaliou o comprimento da lesão (CLesão), o número de pontos de infecção na folha (PI) e incidência de folhas com sintomas (INC) em campo. As variáveis de produção avaliadas foram: (1) peso das inflorescências em gramas (PIF); (2) produtividade comercial em t ha<sup>-1</sup> (PDT); (3) relação entre os diâmetros - *ratio* (RLD) obtida a partir das medidas opostas, onde quanto mais próximo o valor de 1, mais circular e compacta é a inflorescência; (4) número total de folhas (NTF). Eles foram submetidos à análise de variância, teste da Mínima Diferença Significante (LSD) a 5% e teste de Dunnet utilizando o mesmo programa computacional.

#### 2.2.5 – Ensaio em campo

O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico (LVd) (Santos et al. 2013). Para o preparo da área, utilizou-se um subsolador, objetivando a descompactação do solo. Para facilitar o plantio e os tratos culturais, fez-se uso de um microtrator com enxada rotativa para nivelamento do solo. A implantação dos ensaios foi precedida de uma análise de



solo, tendo sido coletadas dez subamostras na profundidade de 0 a 20 cm. Essas subamostras formaram uma amostra composta. Os resultados das análises químicas das amostras da área experimental estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultado das análises de solo da área experimental, 2019. Brasília, DF, Brasil.

Ano	pH	MO	P*	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	H + Al <sup>3+</sup>	Al <sup>3+</sup>
		g dm <sup>-3</sup>	----- mg dm <sup>-3</sup> -----			-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			
2019	5,9	47,1	34,3	329	10	5,9	1,5	4,6	0,0

\*Mehlich 1.

No ensaio de campo, para a correção e adubação foram utilizados 0,83 t ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico com PRNT de 90%, 260 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 160 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e 150 kg ha<sup>-1</sup> de N. O nitrogênio foi parcelado em quatro vezes durante o ciclo da cultura (38 kg ha<sup>-1</sup> no plantio, 38 kg ha<sup>-1</sup> após o estabelecimento das mudas, 38 kg ha<sup>-1</sup> vinte dias após e 38 kg ha<sup>-1</sup> no início da formação da inflorescência), além de adubação de 4 kg de boro via solo e foliar.

A irrigação foi realizada por aspersão, com uma rega diária utilizando uma lâmina de 12 mm durante uma hora (Marouelli et al. 2017). As demais práticas culturais e controle fitossanitário foram realizados de acordo com o recomendado para a cultura (May et al. 2007).

A semeadura das cultivares Cindy e EACF 2000 foi realizada em 3 de setembro de 2019, com o plantio de mudas aos 30 dias após o semeio (DAS). As mudas foram produzidas nas condições já citadas em 2.2.1. O espaçamento utilizado foi de 0,8 m entre linhas, 0,4 m entre plantas e 1,0 m entre blocos. As plantas foram inoculadas aos 31 dias após o plantio (DAP) com uma suspensão bacteriana preparada como acima em 2.2.3. Para a aplicação do inóculo, as condições foram como as já descritas em 2.2.3. Durante o período do experimento em campo, os dados meteorológicos registrados foram coletados em estação próxima ao local do experimento, apresentado pelas médias mensais (Tabela 2).

**Tabela 2.** Médias de precipitação, temperatura e umidade obtidas na estação agrometeorológica da Embrapa Hortaliças – 2019. Brasília, DF, Brasil.

Mês	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)		Umidade (%)	
		Máx.	Mín.	Máx.	Mín.
Setembro	4,8	33,0	18,2	42,0	18,7
Outubro	104,2	32,7	18,5	69,9	24,8
Novembro	159,2	29,9	18,1	79,3	40,7
Dezembro	187,2	29,4	18,2	81,3	44,9

A aplicação dos tratamentos teve início aos 26 (DAP), repetindo-se a cada semana até o final do ciclo. No total, foram feitas cinco aplicações. Os tratamentos consistiram na integração dos agrotóxicos disponíveis no mercado local com indicação para uso em couve-flor (Tabela 3). Os tratamentos foram comparados a um tratamento com uma cultivar considerada resistente (EACF 2000, Eagle) sem aplicação e com tratamento com a cultivar considerada suscetível (Cindy, Sakata) sem aplicação, além de um tratamento com aplicação de oxiclureto de cobre e mancozebe (Cuprozeb®, 30% i.a.). Para a aplicação dos produtos foi utilizado um pulverizador costal pressurizado por  $\text{CO}_2$  (2,8 kgf  $\text{cm}^2$ , munido de barra com dois bicos de jato plano TTI 110015, espaçados de 0,7 m, com consumo equivalente a 200 L  $\text{ha}^{-1}$ ). Para aplicação do tratamento com Biobac® por drench, utilizou-se o pulverizador bomba costal (Guarany) com capacidade de 5 L, dose recomendada de 15 mL/planta.

Os agrotóxicos utilizados foram: Cuprozeb® (oxicloreto de cobre; mancozebe) Sipcam Nichino (dose recomendada: 200g/100L); Biobac® (*Bacillus subtilis* linhagem Y1336) Arysta (1kg/100L); Kasumin® (casugamicina)UPL (300mL/100L); Nativo® (trifloxistrobina; tebuconazol) Bayer (0,25L/100L). Para o controle de pragas e doenças foram utilizados inseticidas e fungicidas recomendados para a cultura, de acordo com a ocorrência do agente, inseto ou patógeno na área experimental, adotando-se a dose recomendada pelo fabricante. O controle de plantas invasoras foi feito com capina manual. O delineamento experimental está

descrito no item 2.2.4. A inoculação ocorreu em 2 dias após a segunda aplicação dos produtos, aos 32 (DAP), conforme descrito no item 2.2.3. A análise estatística foi realizada de acordo com o item 2.2.4.

As colheitas foram realizadas em 03 de dezembro [30 dias após a inoculação (DAI)], 09 de dezembro (36 DAI), 12 de dezembro (39 DAI) e 17 de dezembro (44 DAI). Nessa ocasião avaliou-se, além das variáveis de produção e a severidade da doença. A variável relacionada ao nível de doença foi incidência (INC). As variáveis de produção avaliadas foram: (1) peso das inflorescências em gramas (PIF); (2) produtividade comercial em t ha<sup>-1</sup> (PDT); (3) relação entre os diâmetros - *ratio* (RLD) obtida a partir das medidas opostas, onde quanto mais próximo o valor de 1, mais circular é a inflorescência; (4) número total de folhas (NTF).

**Tabela 3.** Tratamentos utilizados no ensaio de couve-flor, em campo, 2019. Brasília, DF, Brasil.

Código	Tratamentos
T-1	4 aplicações de Biobac <sup>1</sup> , 4 aplicações de Cuprozeb <sup>2</sup> (BBBB CZCZCZCZ)
T-2	4 aplicações de Nativo <sup>3</sup> , 4 aplicações de Cuprozeb (NNNN CZCZCZCZ)
T-3	4 aplicações de Biobac, 4 aplicações de Kasumin <sup>4</sup> (BBBB KKKK)
T-4	4 aplicações de Nativo, 4 aplicações de Kasumin (NNNN KKKK)
T-5	4 aplicações alternadas de Biobac e Nativo, 4 aplicações de Cuprozeb (BNBN CZCZCZCZ)
T-6	4 aplicações alternadas de Biobac e Nativo, 4 aplicações de Kasumin (BNBN KKKK)
T-7	4 aplicações de Biobac, 4 aplicações alternadas de Cuprozeb e Kasumin (BBBB CZKCZK)
T-8	4 aplicações de Nativo, 4 aplicações alternadas de Cuprozeb e Kasumin (NNNN CZKCZK)
T-9	4 aplicações de Biobac e Nativo, 4 aplicações alternadas de Cuprozeb e Kasumin (BNBN CZKCZK)
T-10	Aplicação semanal de Cuprozeb (CZCZCZCZCZCZCZ)
T-11	Cultivar suscetível (Cindy <sup>5</sup> ) sem aplicar
T-12	Cultivar resistente sem aplicar (EACF 2000 <sup>6</sup> )

<sup>1</sup>Biobac® (*Bacillus subtilis* linhagem Y1336) Arysta; <sup>2</sup>Cuprozeb® (oxicloreto de cobre; mancozebe) Sipcam Nichino; <sup>3</sup>Nativo® (trifloxistrobina; tebuconazol) Bayer; <sup>4</sup>Kasumin®

(casugamicina) UPL;<sup>5</sup>Cindy (Sakata Seed Sudamerica Ltda); <sup>6</sup>EACF 2000 (Eagle Flores, Frutas e Hortaliças EIRELI).

## 2.2.6 - Ensaio em casa de vegetação

A semeadura do híbrido Cindy foi realizada em 22 de maio de 2020 condições citadas em 2.2.1. As mudas foram plantadas em vasos de 0,7 L contendo a seguinte mistura: 9 kg de substrato comercial (Bio Planta Plus®, 10 kg de solo autoclavado e 150 g de fertilizante de liberação lenta, Osmocote®) aos 22 (DAS). As plantas foram tratadas no estágio de 3 – 4 folhas verdadeiras, com duas aplicações, a primeira aos 15 (DAP) e 21 (DAP). Os tratamentos consistiram na aplicação dos seguintes agrotóxicos: T1 - Amistar Top® (azoxistrobina; difenoconazol) Syngenta (50 mL/100 L); T2 - Timorex Gold® (óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*) Stockton (2 L/200L); T3 - Nativo® (trifloxistrobina; tebuconazol) Bayer (0,25L/100L); T4 - Cuprozeb® (oxicloreto de cobre; mancozebe) Sipcam Nichino (dose recomendada: 200g/100L); T5 - Biobac® (*Bacillus subtilis* linhagem Y1336) Arysta (1kg/100L) aplicação via drench; T6 - Biobac® (*Bacillus subtilis* linhagem Y1336) Arysta (1kg/100L) e foliar; T7 - Kasumin® (casugamicina) UPL (300mL/100L); e, os tratamentos foram comparados a um tratamento com aplicação de água (T8) e um tratamento sem aplicação (T9). Para a aplicação, foi utilizado um pulverizador costal manual eletrostático com capacidade de 20 L (Tupan Sistemas de Pulverização Eletrostática®/ Tecnologia Embrapa). A ponta do equipamento é composta de dois bicos cônicos em ângulo, Teejet®, modelo TXA800050VK, com vazão de 0,25 L/min em cada bico, com equipamento ligado. Para aplicação do tratamento por drench, utilizou-se o pulverizador bomba costal (Guarany) com capacidade de 5 L, dose recomendada de 15 mL/ planta.

A inoculação do patógeno foi realizada um dia após a última aplicação dos tratamentos, de acordo com o item 2.2.3. As plantas foram avaliadas aos dez (DAI). As variáveis analisadas quanto à severidade da doença foram: o comprimento da lesão em duas folhas

(CLesão), o número de pontos de infecção em duas folhas (PI) e nota das três folhas mais atacadas que compõem o índice de severidade (IS), de acordo com o item 2.2.4.

### **3 – Resultados**

#### 3.1- Avaliação de produtos de proteção fitossanitária em campo

Foi detectado diferenças significativas entre os tratamentos para a variável INC ( $P = 0,005$ ), com o tratamento NNNN CCCC (73,01 %) de incidência, sendo o único que se distinguiu da referência Cindy sem aplicação, resultando, no entanto, em maior severidade da doença. Para as variáveis de produção, houve diferenças significativas entre os tratamentos para a variável peso da inflorescência ( $P = 0,009$ ) e produtividade ( $P = 0,009$ ), sendo o único que se distinguiu foi a referência EACF 2000 sem aplicar, com o maior peso de inflorescência e produtividade. Para as variáveis, relação entre os diâmetros ( $P = 0,12$ ) e número total de folhas ( $P = 0,19$ ) não houve diferenças significativas.

**Tabela 4.** Incidência (INC), relação entre diâmetros (ratio) (RDIF), número total de folhas (NTFOLHAS), peso da inflorescência (PIF) e produtividade (PRODUT) nos diferentes programas de tratamentos da podridão negra em couve-flor, 2019. Brasília, DF, Brasil.

Programas <sup>1</sup>	INC (%)	RDIF	NTFOLHAS	PIF (g)	PRODUT (t/ha)
BBBB <sup>1</sup> CCCC <sup>2</sup>	61,11 bc*	1,08 <sup>NS</sup>	25,21 <sup>NS</sup>	519,87 bc*	16,25 bc*
BBBB CKCK	60,90 bc	1,06	24,45	547,55 b	17,11 b
BNBN <sup>3</sup> KKKK <sup>4</sup>	67,15 ab	1,06	27,25	538,00 bc	16,81 bc
BNBN CCCC	56,34 c	1,06	28,16	540,69 bc	16,90 bc
CCCC CCCC	66,84 ab	1,05	28,40	533,50 bc	16,67 bc
EACF <sup>5</sup>	61,60 bc	1,04	27,30	719,05 a	22,47 a
CINDY <sup>6</sup>	54,50 c	1,03	28,92	438,45 bc	13,70 bc
NNNN CCCC	73,01 a	1,03	22,70	411,10 c	12,85 c
NNNN KKKK	65,98 ab	1,02	25,58	480,61 bc	15,02 bc
BNBN CKCK	66,14 ab	1,01	24,55	444,05 bc	13,88 bc
NNNN CKCK	65,89 ab	0,97	26,95	474,60 bc	14,83 bc
BBBB KKKK	67,10 ab	0,97	25,65	477,60 bc	14,93 bc
C.V (%)	9,18	5,24	11,80	18,39	18,39

<sup>1</sup>B= *Bacillus subtilis* linhagem Y1336 (1 kg/100L);<sup>2</sup>C= oxiclreto de cobre; mancozebe (200 g/100 L); <sup>3</sup>N= trifloxistrobina; tebuconazol (0,25L/100 L); K= casugamicina (300 mL/100 L); <sup>5</sup>EACF sem aplicar; <sup>6</sup>Cindy sem aplicar. \* Médias seguidas de mesma letra na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Student, a 5% de probabilidade. NS: não significativo. Os programas foram aplicados a cultivar Cindy.

### 3.2 - Avaliação de produtos de proteção fitossanitária em casa de vegetação

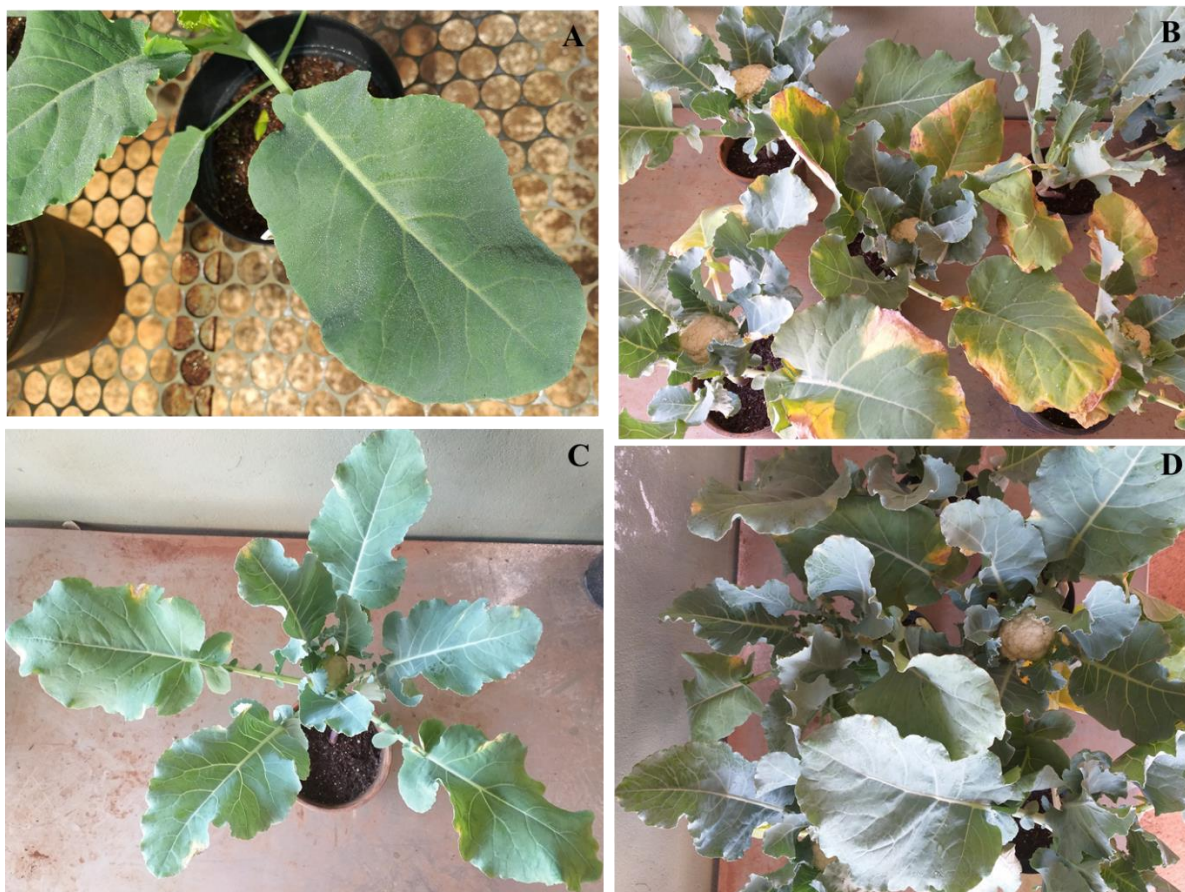
Em casa de vegetação, foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas: CLesão ( $P = 0,004$ ), PI ( $P < 0,0001$ ) e IS ( $P = 0,001$ )

(Tabela 5). O tratamento que teve melhor desempenho frente a podridão negra foi Biobac® (*Bacillus subtilis* linhagem Y1336) (Figura 1) em todas as variáveis analisadas.

**Tabela 5.** Comprimento da lesão em centímetros (CLesão), índice de severidade em porcentagem (IS), pontos de infecção na folha (PI) nos diferentes tratamentos para controle da podridão em couve-flor cv. Cindy, 2020. Brasília, DF, Brasil.

Tratamentos <sup>1</sup>	CLesão (cm)	IS (%)	PI
Aplicação com água	3,33 a	2,77 ab	10,84 a
Azoxistrobina e difenoconazol	3,10 a	3,25 a	12,30 a
Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	2,97 a	2,78 ab	12,00 a
Sem aplicar	2,83 a	3,10 a	7,84 b
Casugamicina	2,84 a	2,99 a	7,64 b
Trifloxistrobina e tebuconazol	2,84 a	2,94 a	7,73 b
<i>Bacillus subtilis</i> drench	2,73 ab	2,32 bc	10,60 a
Oxicloreto de cobre e mancozebe	2,13 bc	2,73 ab	7,04 b
<i>Bacillus subtilis</i> foliar	1,73 c	1,82 c	3,77 c
C.V (%)	14,59	11,44	15,18

<sup>1</sup> Tratamentos aplicados na cultivar Cindy (Sakata Seed Sudamerica Ltda). azoxistrobina; difenoconazol (50 mL/100 L); óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (2 L/200L); trifloxistrobina; tebuconazol (0,25 L/100 L); oxicloreto de cobre; mancozebe (200 g/100 L); *Bacillus subtilis* linhagem Y1336(1 kg/100L) aplicação via drench; *Bacillus subtilis* linhagem Y1336 (1 kg/100L) foliar; casugamicina (300 mL/100 L).



**Figura 1.** Ensaio com produtos de proteção para controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) em couve-flor, realizado em casa de vegetação. (A) Gotas depositadas na folha de couve-flor resultante da pulverização eletrostática, (B) Plantas de couve-flor tratadas com azoxistrobina e difenoconazol e inoculadas com Xcc (C) Planta tratada com *Bacillus subtilis* (pulverização foliar) e inoculada com Xcc, (D) Plantas tratadas com *Bacillus subtilis* (pulverização foliar) e inoculadas com Xcc.

#### 4 - Discussão

As hortaliças, devido ao seu cultivo intenso, estão sujeitas a ataques de pragas e doenças, durante o ano todo, dependendo de controle químico para manter a produtividade e sanidade da lavoura. Essas culturas têm poucos agrotóxicos registrados, em consequência, falta suporte fitossanitário para um controle químico legalizado (Cruz 2013). Assim, além de não haver muitos produtos registrados para uso em couve-flor, apenas um, Duravel® *Bacillus*



*amyloliquifaciens* MBI600, tem como alvo a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Contudo, seu registro ocorreu após a realização dos ensaios realizados e aqui descritos.

No presente trabalho, foram testados os produtos que tinham registro para a cultura da couve-flor, mas com indicação para outros alvos, como azoxistrobina, trifloxistrobina e tebuconazol (*Alternaria brassicae*), mancozebe e oxicloreto de cobre (*Peronospora parasitica*) (Agrofit 2020). Em condições de campo, nenhum produto reduziu a severidade da podridão negra, mesmo o tratamento padrão com oxicloreto de cobre não teve efeito na doença. Uma das causas seria a baixa porcentagem de cobre na formulação do produto utilizado (17% de cobre). Schumann (2018) nos seus estudos, observou que plantas de repolho tratadas com fertilizante foliar à base de cobre (concentrações de 0,5%, 0,75% e 1%) a severidade da podridão negra foi reduzida. Com os tratamentos, 0,75% e 1%, sendo mais eficientes que o tratamento com o produto Kocide® (53,8% de hidróxido de cobre). No entanto, em altas concentrações, o elemento cobre pode provocar fitotoxidez nas plantas. Além disso, esse tipo de controle também não é seletivo, muitas vezes elimina apenas bactérias superficiais ou epifíticas, sendo pouco eficaz contra fitopatógenos sistêmicos, como Xcc (Mew e Natural, 1993).

O tratamento onde se aplicou estrobilurina e triazol associada com oxicloreto de cobre apresentou a maior severidade em condições de campo. As estrobilurinas causam alterações no metabolismo e crescimento vegetal, gerado pelo aumento da fotossíntese líquida, pois reduz temporariamente a respiração das plantas, provocando menor perda de carbono e fornecendo mais energia para a planta (Koehle et al. 1994), o que pode ter influenciado negativamente no controle da doença. Os triazóis também causam efeitos fisiológicos nas plantas. Alguns desses efeitos são: redução da altura e engrossamento do caule na cultura do tomateiro (Berova e Zlatev 2000), em algumas culturas o tratamento com triazóis retarda a senescência (Flecher et al. 2000), essas alterações fisiológicas em couve-flor ainda não foram

estudadas, devem ser objeto de mais investigações para elucidar se aplicações de estribirulinas e triazóis têm efeito negativo no controle da podridão negra.

No presente trabalho, o tratamento mais eficiente no controle da podridão negra foi o controle biológico aplicado via foliar, em casa de vegetação. O gênero *Bacillus* é bem conhecido como agente de biocontrole, para diversos fitopatogenos, como: *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris* spp., *Phytophthora* spp., *Pectobacterium carotovorum*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum acutatum* (Park et al. 2013; Fira et al. 2018; Gabbardo et al. 2020). Estirpes de *B. subtilis*, isoladas de amostras de couve-flor, foram pulverizadas em plantas de couve-flor uma semana antes da inoculação do patógeno, e reduziram a incidência de Xcc em percentuais menores que o tratamento controle com estreptomicina (Singh et al. 2010). Quando a aplicação é feita precocemente, é possível que a colonização do agente de biocontrole nas folhas da couve-flor seja favorecida, podendo ocupar os microssítios disponíveis nesse ambiente e até mesmo nos vasos do xilema (Singh et al. 2010). Não foi observado os mesmos efeitos na redução da severidade da doença, no ensaio de campo. O que pode ter contribuído para esse resultado foi o modo de aplicação via drench, visto que Xcc é um patógeno foliar, a aplicação foliar pode ser mais efetiva no controle da doença.

Apesar de não ter sido o objetivo do presente trabalho, a pulverização eletrostática permite aplicações mais eficientes, menores gotas e melhor deposição do agrotóxico sobre a folha. A deposição do produto fitossanitário no alvo desejado está intimamente ligada à sua eficácia biológica, sendo aquela correlacionada também ao espectro de gotas produzidas na pulverização. Gotas menores podem melhorar resultados de cobertura foliar e número de gotas impactadas em uma folha, porém são mais suscetíveis à deriva, tanto por evaporação quanto por serem facilmente carregadas pelo vento (Minguela e Cunha, 2013). A utilização da técnica de pulverização eletrostática gera gotas com tamanhos entre 50 µm a 100 µm de

diâmetro, onde ocorre a deposição expressiva de agrotóxico na face interior das folhas (Chaim, 2006). Em brássicas, a eficiência na deposição da gota é importante, pois a cerosidade foliar repele a água dificultando a pulverização dos agrotóxicos. A utilização da pulverização eletrostática precisa de mais estudos para avaliar os efeitos dessa deposição em brássicas.

## **5 - Conclusão**

Em condições de campo, nenhum programa de integração dos agrotóxicos estudados teve desempenho superior no controle da podridão na cultivar Cindy. Já em casa de vegetação, o agrotóxico com princípio ativo *Bacillus subtilis* reduziu a severidade da doença, quando aplicado por pulverização foliar. Aplicação foliar de *B. subtilis* deve ser testada em campo aferindo-se o número de aplicações, doses e tecnologia de aplicação, a fim de se proporcionar boa eficiência de controle.

## 6 – Referências Bibliográficas

---

- Abul-Fadl MM (2012) Nutritional and chemical evaluation of white cauliflower by-products flour and the effect of its addition on beef sausage quality. *Journal of Applied Sciences Research* 8: 693-704.
- Agrofit (2020) Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 26 de outubro de 2020.
- Aires A, Dias CSP, Carvalho R, Oliveira MH, Monteiro AA, Simoes MV (2011) Correlations between disease severity, glucosinolate profiles and total phenolics and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* inoculation of different *Brassicaceae*. *Science Horticulturae* 129: 503–510.
- Barbosa JC, Maldonado Junior W (2015) AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Jaboticabal, FCAV/UNESP. p.396
- Berova M, Zlatev Z (2000) Physiological response and yield of paclobutrazol treated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Plant Growth Regulation* 30:117-123.
- Chaim A (2006) Pulverização Eletrostática: principais processos utilizados para eletrificação de gotas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 17 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 57).
- Clark H, Stephen D (1905) On the Bactericidal Action of Copper. *Public health papers and reports* 31:175–204.
- Cruz D (2013) As hortaliças e o registro de agrotóxicos. *Horticultura Brasileira*, 31: 0-0.
- Da Silva RS, de Oliveira MMG, de Melo JO, Blank AF, Corrêa CB, Scher R, Fernandes R P M (2019) Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 160: 40-48.

- Da Silva RS, De Oliveira MMG, Silva KP, Rodrigues IDSV, Pinto VDS, Blank AF, Fernandes RPM (2020) Synergistic effect of *Cordia curassavica* Jacq. essential oils association against the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Environmental Science and Pollution Research 27: 4376-4389.
- Dunegan JC, Kienholz JR, Wilson RA, Morris WT (1954) Control of pear blight by a streptomycin–terramycin mixture. Plant Disease Reporter 38: 666–669.
- Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S (2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. Journal of Biotechnology 285:44–55.
- Fletcher RA, Gilley A, Davis TD, Sankhla N (2000) Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. Horticulture Reviews 24: 55-138.
- Gabardo G, Dalla Pria M, Prestes AMC, da Silva HL (2020) *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. Brazilian Journal of Development 6: 55870-55885.
- Iacobellis NS, Cantore PL, Capasso F, Senatores F (2005) Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:57–61
- Köhle H, Grossmann K, Jabs T, Gerhard M, Kaiser W, Glaab J, Herms S (2002) Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In: Dehne, H.W.; Gisi, U.; Kuck, K.H.; Russell, P.E.; Lyr, H. (Ed.). Modern fungicides and antifungal compounds III. Andover, 2002. pp. 61–74.
- Koppen W, Geiger R (1928) Klimate der Erde. Gotha: Verlag Justus Perthes, 1928
- Lopes CA, Quezado-Soares AM (1997) Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQ; EMBRAPA-SPI. pp. 70.
- Lugo AJ, Elibox W, Jones JB, Ramsbhag A (2013) Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. European Journal of Plant Pathology 136:61–70.

- Marouelli WA, MELO RDC, Braga MB (2017) Irrigação no cultivo de brássicas. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E).
- May A, Tivelli S, Vargas PF, Sanra AG, Sacconi LV, Pinheiro MQ (2007) A cultura da couve-flor. Campinas: Instituto Agronômico. (Boletim técnico 200).
- McKinney HH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research 26: 195-217
- Melo RA, Vendrame LP, Madeira NR, Blind AD, Vilela NJ (2019) Characterization of the Brazilian vegetable brassicas production chain. Horticultura Brasileira 37: 366-372.
- Mew TW, Natural MP, (1993) Management of *Xanthomonas* diseases. In: Swings JG, Civerolo EL, (eds.) *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall. pp. 341–362.
- Minguela JV, Cunha JPAR (2013) Manual de aplicação de produtos fitossanitários.1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil. pp. 588.
- Moller W, Schroth M, Thomson S (1981) The Scenario of Fire Blight and Streptomycin Resistance. Plant Disease 65: 563–568.
- Monteiro L, Mariano RLR, Souto-Maior AM (2005) Antagonism of *Bacillus* sp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Brazilian Archives Biology and Technology 48:23-29.
- Núñez AMP, Monteiro FP, Pacheco LP, Rodriguez GAA, Nogueira CCA, Pinto FAMF, Medeiros FHV de, Souza JT de (2016) Development and Validation of a Diagrammatic Scale to Assess the Severity of Black Rot of Crucifers in Kale. Journal of Phytopathology 165: 195-203.
- Park J-W, Balaraju K, Kim J-W (2013) Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. Biologic Control 65: 246–257.
- Pérez-García A, Romero D, De Vicente A (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. Current opinion in biotechnology 22: 187-193.

- Peruch LA, Michereff SJ, Araújo IB (2006) Levantamento da intensidade da alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. *Horticultura Brasileira* 24: 464-469.
- Santos HGdos, Jacomine PKT, Anjos LHC dos, Oliveira VAde, Lumbreras JF, Coelho MR, AlmeidaJA de, Cunha TJF, Oliveira JB de (Ed) (2013) Sistema brasileiro de classificação de solos. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa. pp.353
- Schumann IS (2018) Controle da podridão negra do repolho com o uso de fertilizante foliar à base de cobre. Dissertação de Mestrado. Instituto Federal Goiano. Morrinhos, Goiás, Brasil.
- Silva Júnior TAF, Silva JC, Gonçalves RM, Soman JM, Passos JRS, Maringoni AC (2020) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. *European Journal of Plant Pathology* 156:399–411.
- Singh D, Dhar S, Yadav DK (2010) Effect of endophytic bacterial antagonists against black rot disease of cauliflower caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Indian Phytopathology* 63:122–126.
- Taylor JD, Conway J, Roberts SJ, Astley D, Vicente JG (2002) Sources and Origin of Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica Genomes. *Phytopathology* 92: 105–111.
- Umezawa H, Okami Y, Hashimoto T, Suhara Y, Hamada M, Takeuchi T (1965) A new antibiotic kasugamycin. *Journal of Antibiotics* 18:101–104.
- Vicente JG, Holub EB (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* 14:2–18.
- Vigo-Schultz SC, Stangarlin JR, Franzener G, Portz RL, KuhnOJ, Schwan-Estrada KRF (2006) Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. *Semina: ciências agrárias* 27: 515-523.

- Voloudakis AE, Reignier TM, Cooksey DA (2005) Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Applied and environmental microbiology* 71:782–789.
- Wulff EG, Mguni CM, Mortensen CN, Keswani CL, Hockenhull J (2002) Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 317-325.
- Zhao P, Xue Y, Gao W, Li J, Zu X, Fu D, Zhang F (2018) Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides* 101: 10-16.



# Conclusões gerais e perspectivas

---

---

Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de coletados em nove estados e no Distrito Federal, de diversas brássicas, possuem alta variabilidade genética. Foram detectados 65 haplótipos e cinco raças diferentes. Foi encontrada associação de patogenicidade entre Xcc e tomateiro, sendo este, possivelmente, o primeiro relato. A maioria dos isolados foi sensível ao cobre (acima de 200 µg/ml) e resistente à casugamicina nas duas concentrações testadas (50 e 100 µg/ml).

As cultivares de couve-flor disponíveis no mercado nacional apresentam níveis não muito distintos de suscetibilidade à podridão negra. Algumas cultivares, Verona, Veridiana e Vera F1, por terem se posicionando como intermediárias quanto à resistência à podridão negra e mantendo os padrões de produtividade nos ensaios de campo, podem ser recomendadas para o cultivo no período de verão-outono na região do Distrito Federal.

Em condições de campo, nenhum dos programas de integração estudados teve desempenho superior no controle da podridão negra. Já em casa de vegetação, *Bacillus subtilis* diminuiu a severidade da doença, quando aplicado por pulverização foliar. Aplicação foliar desse produto de controle biológico deve ser mais estudada.

Na medida em que novas variedades de couve-flor forem sendo disponibilizadas no mercado nacional, devem ser conduzidos novos ensaios localmente, dada a variabilidade do patógeno aqui demonstrada. Além disso, deve-se continuamente avaliar novos agrotóxicos químicos ou biológicos, que tenham algum potencial de controle das bacterioses, procurando-se aprimorar sua eficiência por meio de ajustes na tecnologia de aplicação. Dessa forma, serão gerados subsídios para a inclusão de Xcc como alvo biológico de importantes princípios ativos nas respectivas bulas e, com isso, atender a demanda do produtor para controle da podridão negra.