



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Seleção de genótipos de cebola resistentes à podridão
bacteriana das escamas e reação de isolados
de *Burkholderia cenocepacia* e *B. orbicola* ao cobre**

Keyla Walescka Lopes da Silva

**Recife – PE
2023**

KEYLA WALESCA LOPES DA SILVA

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE CEBOLA RESISTENTES À PODRIDÃO
BACTERIANA DAS ESCAMAS E REAÇÃO DE ISOLADOS DE *Burkholderia*
cenocepacia E *B. orbicola* AO COBRE**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientador: Dr. Adriano Márcio Freire Silva

**RECIFE – PE
MARÇO – 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586s

Silva, Keyla walescka Lopes da

Seleção de genótipos de cebola resistentes à podridão bacteriana das escamas e reação de isolados de *Burkholderia cenocepacia* e *B. orbicola* ao cobre / Keyla walescka Lopes da Silva. - 2023.
52 f. : il.

Orientador: Marco Aurelio Siqueira da Gama.

Coorientadora: Elineide Barbosa de Souza.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2023.

1. *Allium cepa*. 2. Resistência genética. 3. Controle químico. I. Gama, Marco Aurelio Siqueira da, orient. II. Souza, Elineide Barbosa de, coorient. III. Título

CDD 632

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE CEBOLA RESISTENTES À PODRIDÃO
BACTERIANA DAS ESCAMAS E REAÇÃO DE ISOLADOS DE *Burkholderia*
cenocepacia E *B. orbicola* AO COBRE**

KEYLA WALESCKA LOPES DA SILVA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 08/03/2023.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

EXAMINADORES:

Dr. Júlio Carlos Polimeni de Mesquita

Prof^a. Dra. Lilian Margarete Paes Guimarães

**RECIFE – PE
MARÇO – 2023**

*Aos meus amados pais, **Maria Andrade Lopes**
e **José da Silva Neto**, em reconhecimento aos
inúmeros esforços que me permitiram essa
importante conquista, e pelo referencial em
caráter, humildade e perseverança.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e sabedoria para superar os desafios inerentes a essa caminhada.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela imensurável contribuição à minha formação ética e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco, em especial a equipe técnica do Programa Hortaliças e seus colaboradores da Estação Experimental de Belém do São Francisco, pela viabilização de recursos para a realização do estudo.

Ao estimado Dr. Júlio Carlos Polimeni de Mesquita, sempre cortês e solícito no apoio técnico.

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama, pela orientação e ensinamentos, sendo um referencial de profissionalismo.

Aos meus queridos coorientadores, Prof^a. Dra. Elineide Barbosa de Souza e ao Dr. Adriano Márcio Freire Silva, sempre solícitos e a instigar a busca pelo conhecimento.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco que contribuíram para a minha formação, em especial ao Dr. Jonas Alberto Rios, pelo apoio e incentivo.

Ao querido Romildo Angeiras, sempre cortês e prestativo.

Aos amigos da Fitopatologia, Larissa Almeida, Felipe Araújo, Maria Roselane, Erasmo Ribeiro, Géssyka Albuquerque, Ailton Cruz, Bruno Mendes, Diana Barreto, Brendo Silva, Luciana Tajany, e Neri Biazus, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Fitobacteriologia, Lucas Lucena, Rodrigo Pimentel, Lucas Amancio, Igor Pimentel, Stefany Mendes, Lucas Nascimento, e em especial aos queridos, David Ferreira, Fernanda Corona, Fernanda Larisse e Maria Clara, pelo apoio, ensinamentos e os inúmeros sorrisos compartilhados entre um café e outro, ao som de “clássicos do brega”, tornando os dias e principalmente as madrugadas menos árduas.

As estimadas amigas, Cynthia Rocha, Elisabete Albuquerque, Julianny Assunção, Bianca Galúcio, Jacqueline Pereira e Renata, pelo apoio incondicional e companheirismo.

À minha família, em especial aos meus pais, Maria Andrade e José Neto, pelo amor incondicional, incentivo e companheirismo.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista, o meu singelo agradecimento.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO GERAL	7
GENERAL ABSTRACT.....	8
CAPÍTULO I.....	9
INTRODUÇÃO GERAL	10
1. A cultura da cebola.....	10
2. Podridão das escamas da cebola.....	11
3. <i>Burkholderia cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i>	14
4. Fontes de resistência.....	15
5. Sensibilidade a cúpricos	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO II.....	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
Origem dos isolados, condições de cultivo e preparo de suspensão	31
Análise da agressividade dos isolados de <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i>	31
Seleção de genótipos de cebola resistentes a <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i>	32
Avaliação da estabilidade da resistência de genótipos de cebola a <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i>	33
Determinação da concentração mínima inibitória de cobre a isolados de <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i>	33
Sensibilidade de isolados de <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i> ao cobre <i>in vitro</i>	34
Análises estatísticas	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
Análise da agressividade dos isolados de <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i>	35
Seleção de genótipos de cebola resistentes a <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i>	36
Avaliação da estabilidade da resistência de genótipos de cebola a <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i>	37
Determinação da concentração mínima inibitória de cobre a isolados de <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i>	37
Sensibilidade dos isolados de <i>B. cenocepacia</i> e <i>B. orbicola</i> ao cobre <i>in vitro</i>	39
REFERÊNCIAS	39
CONCLUSÕES GERAIS	51

RESUMO GERAL

A cebola (*Allium cepa* L.) está sujeita a uma série de doenças de diferentes etiologias, sendo a podridão bacteriana das escamas, causada por espécies do complexo de *Burkholderia cepacia* (CBC), uma das doenças de maior importância para a cebolicultura. Entre as espécies do CBC, *B. cenocepacia*, *B. orbicola*, *B. semiarida*, e *B. sola* foram recentemente associadas a doença no Nordeste do Brasil, sendo observada a predominância de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* nesta região. Diante do exposto, este estudo teve como objetivos selecionar genótipos de cebola resistentes a *B. cenocepacia* e *B. orbicola*, e avaliar a reação de isolados dessas espécies ao cobre. Inicialmente, 9 isolados de *B. cenocepacia* e 10 isolados de *B. orbicola* foram inoculados em bulbos de cebolas comerciais para determinação dos níveis de agressividade. Em seguida, bulbos de 44 genótipos de cebola pertencentes aos programas de melhoramento genético de cebola da Embrapa Hortaliças e do Instituto Agronômico de Pernambuco foram inoculados com o isolado mais agressivo de cada espécie, sendo selecionados 28 genótipos resistentes a *B. cenocepacia* e 23 genótipos a *B. orbicola*. Posteriormente, os três isolados mais agressivos de cada espécie foram inoculados em bulbos de cebola dos genótipos selecionados, sendo observado que 15 genótipos se mantiveram resistentes a *B. cenocepacia* e 9 genótipos a *B. orbicola*, enquanto os genótipos Baia Periforme Agro-ceres, Beta Cristal, BRS Rio Verde, Crioula Mercosul, IPA 7, Primeiro e Rainha mantiveram-se estáveis para ambas as espécies, indicando a presença de genes com potencial para serem explorados em programas de melhoramento visando à obtenção de variedades de cebola resistentes a doença. A reação ao cobre foi avaliada submetendo-se os três isolados mais agressivos de cada espécie a soluções de sulfato de cobre nas concentrações de 0, 100, 200, 300 e 400 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Não foi observado crescimento bacteriano a partir da concentração de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Os tratamentos nas concentrações de 300 e 400 mg.L⁻¹ de Cu²⁺ foram plaqueados em meio de cultura NYDA e inoculados em catafilos de cebola comerciais, sendo observado o crescimento bacteriano em placa e os sintomas característicos da doença nos catafilos inoculados, demonstrando uma ação bacteriostática do cobre. Posteriormente, suspensões de 18 isolados de *B. cenocepacia* e 45 isolados de *B. orbicola* foram inoculadas em placas de Petri contendo meio mínimo acrescido de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺, não sendo observado crescimento bacteriano. Conclui-se que 7 genótipos de cebola apresentaram níveis satisfatórios de resistência a *B. cenocepacia* e *B. orbicola*, e que o cobre apresentou atividade bacteriostática sobre essas espécies a partir da concentração de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺.

Palavras-chave: *Allium cepa*, resistência genética, controle químico.

GENERAL ABSTRACT

Onion (*Allium cepa* L.) is subject to several diseases of different etiologies, being sour skin, caused by species from the *Burkholderia cepacea* complex (BCC), one of the most important diseases for onion cultivation. Among the BCC species, *B. cenocepacia*, *B. orbicola*, *B. semiarida*, and *B. sola* have recently been associated with disease in northeastern Brazil, with a predominance of *B. cenocepacia* and *B. orbicola*, in this region. Given the above, this study aimed to select onion genotypes resistant to *B. cenocepacia* and *B. orbicola*, and to evaluate the reaction isolates of these species to copper. Initially, 9 isolates of *B. cenocepacia* and 10 isolates of *B. orbicola* were inoculated into commercial onion bulbs to determine the levels of aggressiveness. Then, bulbs of 44 onion genotypes belonging to the onion genetic improvement programs of Embrapa Hortaliças and Instituto Agrônômico de Pernambuco were inoculated with the most aggressive isolate of each species, selecting 28 genotypes resistant to *B. cenocepacia* and 23 genotypes to *B. orbicola*. Subsequently, the three most aggressive isolates of each species were inoculated into onion bulbs of the selected genotypes, and it was observed that 15 genotypes remained resistant to *B. cenocepacia* and 9 genotypes to *B. orbicola*, while the genotypes Baia Periforme Agro-ceres, Beta Cristal, BRS Rio Verde, Crioula Mercosul, IPA 7, Primeiro and Rainha remained stable for both species, indicating the presence of genes with potential to be explored in breeding programs aimed at obtaining disease-resistant onion varieties. The reaction to copper was evaluated by submitting the three most aggressive isolates of each species to copper sulfate solutions at concentrations of 0, 100, 200, 300 and 400 mg.L⁻¹ of Cu²⁺. No bacterial growth was observed from the concentration of 300 mg.L⁻¹ of Cu²⁺. The treatments at concentrations of 300 and 400 mg.L⁻¹ of Cu²⁺ were plated in NYDA culture medium and inoculated in commercial onion cataphylls, observing bacterial growth in plaque and the characteristic symptoms of the disease in the inoculated cataphylls, demonstrating an action copper bacteriostatics. Subsequently, suspensions of 18 *B. cenocepacia* isolates and 45 *B. orbicola* isolates were inoculated in Petri dishes containing minimal medium plus 300 mg.L⁻¹ of Cu²⁺, with no bacterial growth being observed. It was concluded that 7 onion genotypes showed satisfactory levels of resistance to *B. cenocepacia* and *B. orbicola*, and that copper showed bacteriostatic activity on these species from the concentration of 300 mg.L⁻¹ of Cu²⁺.

Keywords: *Allium cepa*, sour skin, genetic resistance, chemical control.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE CEBOLA RESISTENTES À PODRIDÃO BACTERIANA DAS ESCAMAS E REAÇÃO DE ISOLADOS DE *Burkholderia* *cenocepacia* E *B. orbicola* AO COBRE

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura da cebola

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma das mais antigas hortaliças cultivadas e de mais ampla difusão no mundo (BARBIERI, 2008; OLIVEIRA; MAROUELLI; MADEIRA, 2009), sendo caracterizada entre as espécies pertencentes ao gênero *Allium*, como a mais importante quanto ao volume de produção e valor econômico (RESENDE; COSTA, 2007). O gênero *Allium* pertence à classe Monocotyledoneae, ordem Asparagales e família Alliaceae (VELEZ, 2017), que abrange outras espécies de importância econômica como o alho (*A. sativum* L.), o alho-poró (*A. ampeloprasum* var. *porrum* (L.) J. Gay), e a cebolinha (*A. fistulosum* L.) (KILL; RESENDE; SOUZA, 2007).

Trata-se de uma espécie bienal que, em condições normais, produz bulbos no primeiro ano, a partir das sementes, e sementes no segundo ano, a partir dos bulbos (COSTA; ANDREOTTI, 2002), sendo morfológicamente descrita como uma planta herbácea, constituída de folhas ocas, cerosas ou não, caule subterrâneo e sistema radicular fasciculado (COSTA; ANDREOTTI, 2002; KILL; RESENDE; SOUZA, 2007). A parte comercial é um bulbo tunicado, que apresenta variação em formato, cor, pungência, tamanho e conservação pós-colheita (KILL; RESENDE; SOUZA, 2007).

No Brasil, a cebola destaca-se, ao lado da batata (*Solanum tuberosum* L.) e do tomate (*Solanum lycopersicum* L.), como as hortaliças economicamente mais importantes, tanto pelo volume produzido como pela renda gerada (LEITE, 2014; SILVA, 2016). A produção de cebola é concentrada principalmente nos estados de Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (IBGE, 2023), constituindo a principal atividade econômica para mais de 60 mil famílias (MAROUELLI; COSTA; SILVA, 2005), cuja importância socioeconômica fundamenta-se não apenas em demandar grande quantidade de mão-de-obra, contribuindo para a viabilização de pequenas propriedades, mas também para fixar os pequenos produtores na zona rural, reduzindo a migração para as grandes cidades (COSTA; ANDREOTTI, 2002).

A produção mundial de cebola no ano de 2021 foi de aproximadamente 106,6 milhões de toneladas, sendo as maiores produções registradas na Índia e China, que juntos corresponderam a mais de 47,6% da produção mundial (FAO, 2023). No Brasil, a produção de cebola no ano de 2021 foi de 1.640.628 toneladas, com registro mais expressivo no estado de Santa Catarina, compreendendo 481.233 toneladas. A região Nordeste foi responsável pela produção de 329.682 toneladas, com destaque para os estados da Bahia, com uma produção de 260.399 toneladas, seguido de Pernambuco, com 61.739 toneladas, sendo estes responsáveis por 97,7% da produção regional (IBGE, 2023).

As diferentes regiões produtoras de cebola do país apresentam diversidade quanto às épocas de semeadura e colheita. A época de plantio deve ser definida em função da compatibilização das exigências fisiológicas da cultivar a ser plantada com as condições ambientais locais e do mercado consumidor (COSTA; RESENDE, 2007). A região Nordeste tem a vantagem de ser a única região brasileira com condições de ofertar o produto durante todos os meses do ano devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da cultura, como temperatura e fotoperíodo elevados (SILVA, 2016). Para esta região são recomendadas as cultivares de coloração amarela, Vale Ouro IPA-11, Composto IPA-6, Texas Grano-502 PRR, Alfa Tropical, Alfa São Francisco e os híbridos Granex-429, Granex-33 e Mercedes, bem como a cultivar Franciscana IPA-10 de coloração roxa (COSTA; RESENDE, 2007), pela adaptação às condições edafoclimáticas da região, apresentando ótimo desempenho agrônomo, além da elevada resistência ao mal-de-sete-voltas (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) e à mancha púrpura (*Alternaria porri* Ell.), e moderada tolerância ao tripses (*Thrips tabaci* Lind.) (COSTA; RESENDE, 2007; SANTO et al., 2010).

A cebolicultura pode ser comprometida pela ocorrência de inúmeras doenças, tanto no campo, acometendo as mais diversas partes da planta, como na fase de pós-colheita (GAVA; TAVARES, 2007; OLIVEIRA et al., 2019). Dentre essas doenças, destaca-se a podridão bacteriana das escamas, a qual apresenta ocorrência generalizada e pode causar perdas de até 50% da produção (WORDELL FILHO; BOFF, 2006).

2. Podridão das escamas da cebola

A podridão das escamas caracteriza-se como um conjunto de podridões associadas a diferentes espécies de bactérias, como *B. gladioli* pv. *alliicola* (Burkholder) Young et al., *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (WORDELL FILHO; BOFF, 2006), *Serratia marcescens* Bizio (MARQUES et al., 1994) e aquelas pertencentes ao complexo *B. cepacia*

(CBC), como *B. cenocepacia* Vandamme et al. (OLIVEIRA et al., 2017), *B. orbicola* (MORALES-RUÍZ et al., 2022), *B. cepacia* (Palleroni e Holmes) Yabuuchi et al., *B. semiarida* Velez et al. e *B. sola* Velez et al. (VELEZ, et al., 2023). Não obstante, a sintomatologia e o nome da doença podem variar em função da bactéria envolvida, sendo a podridão causada por espécies do CBC comumente conhecida como camisa d'água ou podridão bacteriana das escamas devido a deterioração restrita às escamas mais externas dos bulbos, com as escamas internas sem sintomas (BURKHOLDER, 1950; SILVA et al., 2018). Adicionalmente, é importante mencionar que a doença foi registrada pela primeira vez em Nova York, em 1950, ocasião em que recebeu o nome de “sour skin” devido ao seu característico odor avinagrado (BURKHOLDER, 1950).

As principais bactérias associadas a podridão bacteriana das escamas na região Nordeste pertencem ao CBC (SILVA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; BAIA et al., 2021), o qual se caracteriza como um conjunto formado por 24 espécies estreitamente relacionadas (EBERL; VANDAMME, 2016; MORALES-RUÍZ et al., 2022) que apresentam alta similaridade nas sequências dos genes 16S rDNA (98-100%) e *recA* (94-95%), com moderada hibridização DNA-DNA (30-50%) (COENYE et al., 2001) e identidade média de nucleotídeos (average nucleotide identity - ANI) do genoma abaixo de 90% (PEETERS et al., 2016), sendo caracterizadas como versáteis patógenos de plantas, saprófitas, agentes de biocontrole, agentes de biorremediação e patógenos oportunistas de humanos (PARKE, 2000). Dentre as espécies pertencentes ao CBC associadas à doença, recentemente foram observadas a ocorrência natural de *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. ambifaria* e *B. pyrocinia* na região de Tohoku, no Japão (TSUJI; KADOTA, 2020); e *B. cenocepacia*, *B. orbicola* (BAIA et al., 2021), *B. semiarida* e *B. sola* na região semiárida do Nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 2017; BAIA et al., 2021; VELEZ et al., 2023), sendo as duas primeiras espécies encontradas de forma predominante nesta região (BAIA et al., 2021).

O gênero *Burkholderia*, atualmente classificado no filo *Pseudomonadota*, classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales* e família *Burkholderiaceae* (LPSN, 2023), abriga espécies Gram-negativas, de formato reto ou ligeiramente curvado, medindo 1,0 a 5,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura, apresentando um ou mais flagelos polares, sendo de natureza aeróbia, oxidase e catalase positiva, e não esporulantes (SILVA et al., 2018). As espécies são naturalmente abundantes no solo, água e nas superfícies das plantas (PARKE, 2000), sendo em sua maioria mesófilas, apresentando temperatura ótima de crescimento entre 30° C e 37° C, podendo algumas espécies crescer em temperaturas extremas, como a 4° C e a 42° C (LIPUMA et al., 2011).

Não existem estudos que demonstrem o comportamento de todas as espécies de *Burkholderia* associadas à podridão bacteriana das escamas da cebola. No entanto, essas bactérias são consideradas como parte da flora microbiana normal do solo, sobrevivendo nos restos de cultura e outros restos vegetais, além de bulbos infectados e indevidamente armazenados (GAVA; TAVARES, 2007). No campo, a disseminação ocorre principalmente através da água de irrigação, salpicos da chuva, solo aderido à implementos agrícolas e no processo de transporte dos bulbos (WORDELL FILHO; BOFF, 2006; GAVA; TAVARES, 2007), sendo a infecção favorecida quando em condições de alta umidade do solo e temperaturas elevadas (GAVA; TAVARES, 2007).

A podridão bacteriana das escamas pode ocorrer no campo, porém é verificada com maior frequência após a colheita, podendo ser severa durante o armazenamento dos bulbos (WORDELL FILHO; BOFF, 2006; GAVA; TAVARES, 2007). O patógeno penetra através de aberturas naturais ou em ferimentos causados durante o manejo da cultura e colheita, ou quando as folhas caem durante a maturação dos bulbos, constituindo portas de entrada para as bactérias (WORDELL FILHO; BOFF, 2006; VELEZ, 2021). O ataque ocorre inicialmente nos tecidos foliares mais velhos, mortos ou quase mortos, atingindo a haste ou colo da planta, onde progride até atingir as escamas externas, culminando em seu apodrecimento (GAVA; TAVARES, 2007) devido a atividade degradante de várias enzimas pectinolíticas produzidas pelo patógeno (WORDELL FILHO; BOFF, 2006).

O manejo da doença implica no uso de bulbos e sementes saudáveis (VELEZ, 2021), sendo recomendado o cultivo em solos bem drenados e planos, procedendo com a irrigação e a adubação adequadas (GAVA; TAVARES, 2007). Além disso, deve-se ter cuidado nos tratos culturais durante o ciclo da cultura e no manuseio de bulbos no processo de colheita e armazenamento, evitando-se, principalmente, danos mecânicos que possam comprometer a integridade das escamas ou ferir as folhas próximo ao pescoço, a exposição direta do bulbo ao sol na fase de cura, e o armazenamento de bulbos saudáveis com aqueles infectados (WORDELL FILHO; BOFF, 2006). Os bulbos devem ser mantidos em local fresco e arejado e submetidos à secagem rapidamente para evitar a proliferação do possível inóculo presente na região do colo e o posterior desenvolvimento da doença durante o transporte ou armazenamento (GAVA; TAVARES, 2007).

Existem poucas cultivares de cebola resistentes a doenças de etiologia bacteriana (MCDONALD; JAIME; HOVIUS, 2004), não sendo identificados genótipos comprovadamente resistentes as espécies causadoras da podridão bacteriana das escamas (GAVA; TAVARES, 2016). No entanto, em estudo recente de avaliação de resistência a

isolados de *B. gladioli* pv. *allicola*, agente causal da podridão escorregadia, foram apontados sete genótipos como potenciais fontes de resistência para uso em programas de melhoramento visando à obtenção de variedades de cebola com resistência a doença (VELEZ et al., 2020). Adicionalmente, considerando que apenas um produto a base de *Melaleuca alternifolia* encontra-se registrado no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para manejo de podridões causadas por *B. gadiolli* pv. *allicola* na cultura (AGROFIT, 2023), a avaliação do potencial do cobre poderia contribuir visando a sua utilização no manejo integrado para amenizar de maneira considerável as perdas ocasionadas pela doença (GAVA; TAVARES, 2016).

3. *Burkholderia cenocepacia* e *B. orbicola*

Burkholderia cenocepacia é um patógeno oportunista que causa infecções nosocomiais em indivíduos imunocomprometidos e pacientes com fibrose cística, cujo agravamento pode implicar na fatal “síndrome cepacia”, caracterizada por insuficiência respiratória progressiva e pneumonia necrosante, resultando na morte precoce do indivíduo (WALLNER et al., 2019). Isolados de *B. cenocepacia* têm se mostrado prevalentes em pacientes com fibrose cística, representando mais de 80% dos casos de infecções bacterianas associados a estes indivíduos no Canadá e em diversos países na Europa (AGODI et al., 2002; MCDOWEEL et al., 2004). Além das implicações para a saúde pública, *B. cenocepacia* é também caracterizada como patógeno de plantas causando doenças em culturas agrícolas de importâncias econômica, como a cebola (BAIA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2017) e a banana (LEE et al., 2005; LEE; CHAN, 2007).

Baseado em análises da sequência do gene *recA*, isolados de *B. cenocepacia* têm sido subdivididos em quatro linhagens filogenéticas, caracterizadas como IIIA, IIIB, IIIC e IIID (VANDAMME et al., 2003; SCOFFONE et al., 2017). As linhagens IIIA e IIIB têm sido observadas em pacientes acometidos por fibrose cística e imunodeprimidos (SCOFFONE et al., 2017; WALLNER et al., 2019; VANDAMME et al., 2003), e associadas a podridão bacteriana das escamas da cebola (OLIVEIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019; TSUJI; KADOTA, 2020; BAIA et al., 2021). Os isolados da linhagem IIIC foram relatados como sendo exclusivamente ambientais, ocorrendo apenas em solo, enquanto os isolados pertencentes a linhagem IIID de ocorrência apenas clínica em pacientes com fibrose cística na Suécia, Argentina e Itália (VANDAMME et al., 2003; MANNO et al., 2004; CAMPANA et al., 2005; SCOFFONE et al., 2017).

Estudo posterior, fundamentado em análises filogenéticas e ANI, sugeriu que isolados classificados como *B. cenocepacia*, pertencem a pelo menos duas espécies distintas (WALLNER et al., 2019), defendendo a manutenção do nome *B. cenocepacia* para isolados da linhagem IIIA, e a atribuição do nome *B. servocepacia* para isolados da linhagem IIIB. No entanto, esta última proposição não foi validada devido a inconsistências no nome do isolado tipo (Tatl-371 em vez de TAtl-371), no protólogo que descreve a nova espécie e no depósito do referido isolado (MORALES-RUÍZ et al., 2022), descumprindo a regra 27 e a recomendação 30 do *International Code of Nomenclature of Prokaryotes* (ICNP). Dessa forma, isolados de *B. cenocepacia* linhagem IIIB foram novamente reclassificados, dessa vez como *B. orbicola*, cujo epíteto foi recentemente validado (MORALES-RUÍZ et al., 2022).

4. Fontes de resistência

O uso de cultivares resistentes é caracterizado como o método mais eficiente, econômico e ambientalmente seguro para o manejo de doenças de plantas, pois permite a redução significativa da aplicação de agroquímicos e a associação com outras práticas para o controle efetivo de doenças (CAMARGO, 2011). Além disso, a utilização de cultivares resistentes atende a crescente pressão dos consumidores para a produção de alimentos saudáveis a partir de atividade não danosa a natureza (SANTOS et al., 2013).

A resistência genética é definida como a capacidade da planta em retardar ou suprimir a atividade de um patógeno, reduzindo os danos causados a seus tecidos (PASCHOLATI; LEITE, 1995; VELEZ, 2017). A resistência genética apresenta natureza dinâmica e coordenada, cuja efetividade depende da expressão dos seus mecanismos em uma sequência lógica, após o contato do patógeno com o hospedeiro, de modo a caracterizar um sistema multicomponente, onde o nível de resistência resulta da somatória das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A obtenção de genótipos resistentes a doenças é uma atividade complexa que exige o planejamento estratégico para gerar e manter um determinado genótipo resistente (VELEZ, 2017). Isso deve-se as vantagens seletivas apresentadas pelos patógenos sobre os genótipos hospedeiros, como o rápido ciclo de vida e a facilidade de liberação de novas combinações genéticas de patogenicidade, principalmente em função das mutações espontâneas e seus mecanismos próprios de recombinação sexual ou assexual (MATTIELO; BARBEIRI; CARVALHO, 1997).

O melhoramento para resistência a doenças não difere fundamentalmente do melhoramento para outros caracteres. As etapas básicas de um programa de melhoramento, visando à obtenção de cultivares resistentes, compreende a identificação de fontes de resistência disponíveis no germoplasma da espécie (THUROW; CASTRO; PEREIRA, 2018), seguindo-se a seleção do método de melhoramento para incorporação da resistência em cultivares comerciais, levando-se em consideração, principalmente, a natureza genética da resistência, se qualitativa ou quantitativa, e o tipo de reprodução do hospedeiro, se autógama ou alógama (AGRIOS 2005; CAMARGO 2011). Além disso, também deve-se levar em consideração a definição das estratégias para incorporação dos genes de resistência, traçadas a partir do conhecimento da estrutura genética e do potencial evolucionário das populações patogênicas (THUROW; CASTRO; PEREIRA, 2018).

As cultivares disponibilizadas pela pesquisa em melhoramento genético de cebola no Brasil proporcionaram ganhos significativos em produtividade, diversidade, adaptação a estresses bióticos e abióticos, e possibilitaram a modernização dos sistemas de cultivo, contribuindo de forma efetiva para o desenvolvimento e sustentação da cebolicultura (SANTOS et al., 2013). O melhoramento genético de cebola na região Nordeste do Brasil tem sido executado ininterruptamente desde o ano de 1972, contemplando cebolas roxas e amarelas, com o objetivo de desenvolver cultivares dotadas de elevado potencial produtivo, nível elevado de tolerância ao tripses (*Thrips tabaci*) e de resistência ao mal-de-sete-voltas (*Collectotrichum gloeosporioides*) e a raiz rosada (*Pyrenochaeta terrestris*), considerados como os principais problemas fitossanitários da região Nordeste, bem como, a melhor conservação pós-colheita, pungência moderada e a boa adaptação às condições ambientais locais (COSTA; CANDEIA; ARAUJO, 1999; SOUZA et al., 2008).

Ao longo dos anos, uma série de cultivares foram desenvolvidas na região pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Embrapa Semiárido e Embrapa Hortaliças. Nesse contexto, destaca-se as cultivares pertencentes a série IPA, Alfa Tropical e Alfa São Francisco (SOUZA et al., 2008), oriundas de estudos de adaptação de cultivares com o objetivo de selecionar genótipos mais resistentes a patógenos e apresentando níveis aceitáveis de produtividade, adaptação, qualidade e outros caracteres agrônômicos favoráveis (THUROW; CASTRO; PEREIRA, 2018). No entanto, apesar da significativa importância da podridão bacteriana das escamas causadas por espécies pertencentes ao CBC na região, atrelada a baixa eficiência das medidas de controle disponíveis para o manejo da doença, até o momento não existe registro de cultivares resistentes ou da seleção de genótipos para uso como potencial fonte de resistência a *B. cenocepacia* e *B. orbicola* e demais espécies pertencentes ao complexo

B. cepacia. Por outro lado, sete genótipos (F2 (EHCEB 20151030 x EHCEB 20133015), Cascuda T5, Crioula Mercosul, Juporanga, EHCEB 20111036, Cascuda T6 e EHCEB 20142028) apresentando tolerância a isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* foram recentemente identificados (VELEZ et al., 2020), indicando que acessos de cebola podem ser tolerantes ou resistentes às demais espécies de *Burkholderia* associadas a doença na região Nordeste do Brasil.

5. Sensibilidade a cúpricos

O cobre, em sua forma iônica, é um oligoelemento necessário para a maioria dos organismos procarióticos e eucarióticos, incluindo humanos (SANTO; MORAIS; GRASS, 2010), sendo importante aos processos celulares fundamentais, como fosforilação oxidativa, fotossíntese e controle de radicais livres (BONDARCZUK; PIOTROWSKA-SEGET, 2013), atuando como um cofator essencial a várias enzimas envolvidas na respiração, a exemplo de oxigenases e proteínas transportadoras de elétrons (GARCÍA-HORSMAN et al., 1994).

Apesar de desempenhar um papel essencial nos processos biológicos, o cobre é altamente tóxico quando em excesso (BONDARCZUK; PIOTROWSKA-SEGET, 2013), de modo que em concentrações elevadas apresenta a habilidade de gerar radicais livres capazes de danificar o DNA e membranas lipídicas das células (SILVA, 2017). Essa toxicidade é causada principalmente pelas propriedades intrínsecas do cobre, onde os íons livres sofrem reações de ciclo redox alternando entre Cu (I) e Cu (II), além de resultar na transferência de elétrons para o peróxido de hidrogênio e a geração concomitante de radicais hidroxila que prontamente atacam e danificam as biomoléculas celulares (SANTO; MORAIS; GRASS, 2010).

O cobre tem sido utilizado na medicina e na agricultura (BONDARCZUK; PIOTROWSKA-SEGET, 2013) como componente de agentes antibacterianos, algicidas e fungicidas (LOFTIN et al., 2005). A calda bordalesa foi o primeiro composto antimicrobiano à base de cobre (CABC) utilizado na agricultura, tendo sido descoberto acidentalmente em 1885 pelo cientista francês Pierre-Marie Alexis Millardet (GAYON; SAUVAGEAU, 1903). Segundo Lamichhane et al. (2018), ao contrário da ampla gama de fungicidas disponíveis para controle de doenças de etiologia fúngica, poucos são os bactericidas disponíveis para proteção de culturas anuais e perenes contra bactérias fitopatogênicas.

Os CABCs são estritamente usados como protetores, pois a maioria das complexações químicas não permite a atividade curativa ou sistêmica, sendo esta característica conhecida apenas para o Fulland, um fertilizante foliar a base de cobre (cobre a 3,5%) que promove o

fortalecimento fisiológico natural da planta, contribuindo para o maior aproveitamento de nutrientes e estimulando a produção de substâncias de autodefesa, o qual é indicado para as suas diferentes fases de desenvolvimento. Ao entrar em contato com água e pH baixo, esses compostos liberam lentamente íons de cobre que são tóxicos para as células microbianas, reduzindo de maneira significativa o acúmulo de inóculo e prevenindo a infecção (LAMICHHANE et al., 2018).

De modo geral, o cobre atua na proteção do tecido vegetal contra infecção por bactérias e na redução da população bacteriana na superfície foliar, sendo necessárias várias aplicações de produtos para alcançar o controle adequado das doenças bacterianas (LEITE JÚNIOR, 2000). Nesse contexto, aplicações regulares de produtos cúpricos têm sido adotadas entre as principais práticas de manejo integrado para o controle de doenças bacterianas, a exemplo do programa de manejo integrado para a prevenção e controle do cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Hasse) Vauterin et al. desde o final da década de 80 no estado do Paraná (LEITE JÚNIOR, 2000), e em casos de ausência de produtos registrados para uso no controle de fitobacterioses (SILVA, 2017).

Aplicações contínuas podem conferir resistência de modo a comprometer a eficácia do cobre (BEHLAU et al., 2013). Isolados resistentes ao cobre foram identificados em várias bactérias fitopatogênicas (SILVA, 2017), como recentemente demonstrado em estudo de sensibilidade de isolados de *B. gladioli* a produtos químicos e biológicos, os quais apresentaram resistência natural *in vitro* a produtos à base de cobre, antibióticos e biológicos (SERRET-LOPEZ et al., 2021). Essa característica é também observada entre espécies do CBC que são frequentemente isoladas de solos ácidos onde a biodisponibilidade de cobre é alta, conferindo a esta uma elevada resistência a vários metais pesados (HIGGINS et al., 2020), o que torna evidente a necessidade de estudos de caracterização do comportamento das espécies associadas a podridão bacteriana das escamas em relação ao cobre. Portanto, tendo em vista a significativa importância da podridão bacteriana das escamas para a cebolicultura e a baixa eficiência das medidas de manejo adotadas, este estudo visa selecionar genótipos de cebola resistentes à podridão bacteriana das escamas causada por isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* e avaliar a reação de isolados dessas espécies ao cobre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGODI, A.; BARCHITTA, M.; GIANNINÒ, V.; COLLURA, A.; PENSABENE, T.; GARLASCHI, M. L.; PASQUARELA, C.; LUZZARO, F.; SINATRA, F.;

MAHENTIRALINGAM, E.; STEFANI, S. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients: identification of a cluster of epidemic lineages. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 50, n. 3, p. 188-195, 2002.

AGRIOS, G. N. 2005. **Plant pathology**. 5th ed., New York: Academic press. 922 p.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 de fev. de 2023.

BAIA, A. D. B.; SILVA, A. M. F.; RIBEIRO, B. G.; SOUZA, C. C.; SILVA JÚNIOR, W. J.; BALBINO, V. Q.; LEAL, C. M.; FARIAS, A. R. G.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. Predominance of *Burkholderia cenocepacia* lineages causing onion sour skin in the semi-arid region of north-east Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 70, n. 3, p. 521-533, 2021.

BAIA, A. D. B. **Diversidade de espécies de *Burkholderia* causadoras de podridão em bulbos de cebolas no semiárido brasileiro**. 2019. 111 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BARBIERI, R. L. Cebola. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2008, p. 253-266.

BEHLAU, F.; HONG, J. C.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated *xanthomonads*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 5, p. 409-418, 2013.

BONDARCZUK, K.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **Cell Biology and Toxicology**, Princeton, v. 29, n. 6, p. 397-405, 2013.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, n. 1, p. 115-117, 1950.

CAMARGO, L. E. A. Controle Genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. São Paulo: **Agronômica Ceres**. p.325-340, 2011.

CAMPANA, S.; TACCETTI, G.; RAVENNI, N.; FAVARI, F.; CARIANI, L.; SCIACCA, A.; SAVOIA, D.; COLLURA, A.; FISCARELLI, E.; DE INTINIS, G.; Buseti, M.; CIPOLLONI, A.; D'APRILE, A.; PROVENZANO, E.; COLLEBRUSCO, I.; FRONTINI, P.; STASSI, G.; TRANCASSINI, M.; TOVAGLIARI, D.; LAVITOLA, A.; DOHERTY, C. J.; COENYE, T.; GOVAN, J. R. W.; VANDAMME, P. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 10, p. 5136–5142, 2005.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 10, p. 3427–3436, 2001.

COSTA, N. D.; CANDEIA, J. A.; ARAUJO, M. de T. Importância econômica e melhoramento da cebola no Nordeste do Brasil. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R., ed. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: **Embrapa Semi-Árido**, p. 398-414, 1999.

COSTA, N. D.; ANDREOTTI, C. M. A cultura da cebola. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2002, 109 p. (Coleção Plantar, 45).

COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. de. Cultivares. In: _____ (Ed.). Cultivo de cebola no Nordeste. **Embrapa Semi-Árido**, 2007. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/162405/1/Cultivodacebola.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2023.

EBERL, L; VANDAMME, P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. **F1000Research**, London, v. 5, p. 1007-1017, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics division**. 2023. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>. Acesso em: 17 fev. 2023.

GAVA, C. A. T.; TAVARES, S. C. C. de H.; Doenças. In: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. de (Ed.). Cultivo de cebola no Nordeste. **Embrapa Semi-Árido**, 2007. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/162405/1/Cultivodacebola.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2023.

GARCÍA-HORSMAN, J. A.; BARQUERA, B.; RUMBLEY, J.; MA, J.; GENNIS, R. B. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 18, p. 5587-5600, 1994.

HIGGINS, S.; GUALDI, S.; PINTO-CARBÓ, M.; EBERL, L. Copper resistance genes of *Burkholderia cenocepacia* H111 identified by transposon sequencing. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 12, n. 2, p. 241-249, 2020.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da Produção Agrícola**, 2023. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cebola/br>>. Acesso em: 17 fev. 2023.

JACOBS, J. L.; FASI, A. C.; RAMETTE, A.; SMITH, J. J.; HAMMERSCHMIDT, R.; SUNDIN, G. W. Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 74, n. 10, p. 3121–3129, 2008.

KILL, L. H. P.; RESENDE, G. M. de; SOUZA, R. J. Botânica. In: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. de (Ed.). Cultivo de cebola no Nordeste. **Embrapa Semi-Árido**, 2007. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/162405/1/Cultivodacebola.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2023.

LAMICHHANE, J. R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F.; KÖHL, J.; JONES, J. B.; AUBERTOT, J. N. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 38, p. 1-18, 2018.

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

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

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

LEITE JÚNIOR, R. P. **Surviving with Citrus Canker in Brazil**. Proceedings, 9th Congress of the International Society for Citriculture. Orlando FL. 2000. p. 890-896.

LIPUMA, J. J.; CURRIE, B. J.; PEACOCK, S. J.; VANDAMME, P. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandora*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia* and *Acidovorax*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington DC, ASM Press, p. 692-713, 2011.

LOFTIN, I. R.; FRANKE, S.; ROBERTS, S. A.; WEICHSEL, A.; HÉROUX, A.; MONTFORT, W. R.; RENSING, C.; MCEVOY, M. M. A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. **Biochemistry**, Washington, v. 9, n. 44 (31), p. 40-10533, 2005.

LPSN. **LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE**. 2023. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/>>. Acesso em: 18 fev. 2023.

MANNO, G.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VANDAMME, P.; LORINI, R.; MINICUCCI, L.; ROMANO, L.; GIANNATTASIO, A.; CHIARINI, L.; BEVIVINO, A. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italian cystic fibrosis center. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 4, p. 1491–1497, 2004.

MARQUELLI, W. A.; COSTA, É. L.; SILVA, H. R. Irrigação da Cultura da Cebola. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 2005. 17 p. (Circular técnica, 37).

MARQUES, A. S. A.; ROBBS, C. F.; BOITEUX, L. S.; PARENTE, P. M. Índice de fitobacterioses assinaladas no Brasil. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, 1994. 65p.

MATTIELO, R. R.; BARBEIRI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Resistência das plantas à moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 161-168, 1997.

MCDONALD, M. R.; JAIME, M. de los A.; HOVIUS, M. H. Management of Diseases of Onions and Garlic. In: Naqvi S.A.M.H. (Eds.). **Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II**. Springer, Dordrecht, p. 149-200, 2004.

MCDOWEEL, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; DUNBAR, K. E. A.; MOORE, J. E.; CROWE, M.; ELBORN, J. S. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 53, p. 663-668, 2004.

MORALES-RUIZ L. M.; RODRÍGUEZ-CISNEROS M.; KERBER-DÍAZ J. C.; ROJAS-ROJAS F. U.; IBARRA J. A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS P. *Burkholderia orbicola* sp. nov., a novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 204, n. 3, p. 178, 2022.

OLIVEIRA, V. R.; MAROUELLI, W. A.; MADEIRA, N. R. Cebola. In: MONTEIRO, J. E. B. A. **Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola**. Brasília: Instituto nacional de Meteorologia, 2009. p. 152-165.

OLIVEIRA, W. J. de. **Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido brasileiro**. 2016. 60f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

OLIVEIRA, W. J.; SILVA, W. A.; SILVA, A. M. F.; CANDEIA, J. A.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. First report of *Burkholderia cenocepacia* causing sour skin of onion (*Allium cepa*) in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, p. 1950, 2017.

OLIVEIRA, W. J.; SOUZA, E. B.; SILVA, A. M. F.; LIMA, N. B.; LEAL, C. M. CANDEIA, J. A.; GAMA, M. A. S. Elucidating the etiology of onion bacterial scale rot in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 44, n. 6, p. 494-502, 2019.

PARFITT, K. M.; GREEN, A. E.; CONNOR, T. R.; NEILL, D. R.; MAHENTHIRALINGAM, E. Identification of two distinct phylogenomic lineages and model strains for the understudied cystic fibrosis lung pathogen *Burkholderia multivorans*. **BioRxiv**, New York, 2023.

PASCHOLATTI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.417-453.

PARKE, J. L. ***Burkholderia cepacia*: Friend or Foe? The Plant Health Instructor**. American Phytopathological Society 2000. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/Burkholderiacepacia.aspx>> Acesso em: 17 fev. 2023.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 225-258, 2001.

PEETERS, C.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; VERHEYDE, B.; DE BRANDT, E.; COOPER, V. S.; VANDAMME, P. Phylogenomic Study of *Burkholderia glathei*-like Organisms, Proposal of 13 Novel *Burkholderia* Species and Emended Descriptions of *Burkholderia sordidicola*, *Burkholderia zhejiangensis*, and *Burkholderia grimmiae*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 877, 2016.

RESENDE, G. M. de; COSTA, N. D. Socioeconomia. In: COSTA, N. D.; RESENDE, G. M. de (Ed.). **Cultivo de cebola no Nordeste**. Embrapa Semi-Árido, 2007. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/162405/1/Cultivodacebola.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2023.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 49-55, 2010.

SANTO, C. E.; MORAIS, P. V.; GRASS, G. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 5, p. 1341-1348, 2010.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; LEITE, D. L. **Melhoramento genético de cebola no Brasil**: avanços e desafios. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 22 p. (Documentos, 254).

SCOFFONE, V. C.; CHIARELLI, L. R.; TRESPIDI, G.; MENTASTI, M.; RICCARDI, G.; BURONI, S. *Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1592, 2017.

SERRET-LOPEZ, M.; ARANDA-OCAMPO, S.; ESPINOSA-VICTORIA, D.; ORTIZ-MARTINEZ, L. E.; RAMÍREZ-RAZO, K. Polyphasic characterization of *Burkholderia gladioli* isolated from onion and evaluation of its potential pathogenicity for other crops. **Mexican Journal of Phytopathology**, Texcoco, v. 39, n. 1, p. 21-40, 2021.

SILVA, W. A. da. **Caracterização epidemiológica da podridão em escama da cebola**. 2016. 49f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife

SILVA, E. I. da. **Sensibilidade a cúpricos e estrutura genética de populações de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***. 2017. 82f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, A. M. F.; BAIA, A. D. B.; VELEZ, L. S.; OLIVEIRA, W. J.; GAMA, M. A. S. Diversidade taxonômica e patológica de espécies de *Burkholderia* causadoras de podridão das escamas da cebola. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, v. 26, p. 81-95, 2018.

SILVA, P. T. S.; MEDEIROS, L. R. A.; CUNHA, T. J. F.; COSTA, N. D.; SALVIANO, A. M. **Risco de Contaminação das Águas Superficiais e Subterrâneas por Agrotóxicos em cultivos de Cebola no Entorno do Lago de Sobradinho, Estado da Bahia**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2019, 26 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 137).

SOUZA, J. de O.; GRANGEIRO, L. C.; SANTOS, G. M.; COSTA, N. D.; SANTOS, C. A. F.; NUNES, G. H. de S. Avaliação de genótipos de cebola no Semi-Árido Nordeste. **Horticultura Brasileira**, Vitória da conquista, v. 26, n. 1, p. 97-101, 2008.

THUROW, L. B.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. da S. Melhoramento de plantas visando à resistência a patógenos. In: DALLGNOL, L. J. (Eds.). Resistência genética: de plantas a patógenos. Pelotas: **Ed. UFPel**, p. 65-102, 2018.

TSUJI, M.; KADOTA, I. Identification and phylogenetic analysis of *Burkholderia cepacia* complex bacteria isolated from rot of onion bulbs in Tohoku region of Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 86, p. 376–386, 2020.

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

VANDAMME P.; HOLMES B.; COENYE T.; GORIS J.; MAHENTHIRALINGAM E.; LIPUMA J. J.; GOVAN J. R. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.– a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 154, n. 2, p. 91-96, 2003.

VELEZ, L. S. **Seleção de genótipos de cebola resistentes à *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola***. 2017. 42f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

VELEZ, L. S.; SILVA, A. M. F.; SANTOS, C. A. F.; ASSUNÇÃO, E. F.; SILVA, M. S.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. da. Evaluation of onion genotypes to slippery skin caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*. **Horticultura Brasileira**, Vitória da conquista, v. 38, n. 4, p. 350-355, 2020.

VELEZ, L. S. **Filogenômica e genômica comparativa de isolados de *Burkholderia* causadores de podridão das escamas da cebola.** 2021. 99f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

WALLNER, A.; KING, E.; NGONKEU, E. L. M.; MOULIN, L.; BÉNA, G. Genomic analyses of *Burkholderia cenocepacia* reveal multiple species with differential host-adaptation to plants and humans. **BMC Genomics**, London, v. 20, p. 803, 2019.

WORDELL FILHO, J. A.; BOFF, P. Doenças de origem parasitária. In: WORDELL FILHO, J. A.; ROWE, E.; GONÇALVES, P. A. de S.; DEBARBA, J. F.; BOFF, P.; THOMAZELLI. Manejo fitossanitário da cebola. Florianópolis: **EPAGRI**, 2006. p. 19-162.

CAPÍTULO II

Seleção de genótipos de cebola resistentes à podridão bacteriana das escamas e reação de isolados de *Burkholderia cenocepacia* e *B. orbicola* ao cobre

Seleção de genótipos de cebola resistentes à podridão bacteriana das escamas e reação de isolados de *Burkholderia cenocepacia* e *B. orbicola* ao cobre

Keyla W L da Silva¹, Fernanda Larisse dos S Lima¹, Júlio Carlos P Mesquita², Adriano Márcio F Silva³, Elineide B de Souza¹, Marco Aurélio S da Gama¹ ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, keylawalescka@gmail.com, fernandalarisse17@gmail.com, elineidebs@yahoo.com.br, marco.gama@ufrpe.br; ²Instituto Agrônômico de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, julio.mesquita@ipa.br; ³Instituto Agrônômico de Pernambuco, Belém de São Francisco, Pernambuco, Brasil, adrianomfsilva@yahoo.com.br

RESUMO

A cebola (*Allium cepa* L.) está sujeita a uma série de doenças de diferentes etiologias, sendo a podridão bacteriana das escamas, causada por espécies do complexo de *Burkholderia cepacia* (CBC), uma das doenças de maior importância para a cebolicultura. Entre as espécies do CBC, *B. cenocepacia*, *B. orbicola*, *B. semiarida*, e *B. sola* foram recentemente associadas a doença no Nordeste do Brasil, sendo observada a predominância de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* nesta região. Diante do exposto, este estudo teve como objetivos selecionar genótipos de cebola resistentes a *B. cenocepacia* e *B. orbicola*, e avaliar a reação de isolados dessas espécies ao cobre. Inicialmente, 9 isolados de *B. cenocepacia* e 10 isolados de *B. orbicola* foram inoculados em bulbos de cebolas comerciais para determinação dos níveis de agressividade. Em seguida, bulbos de 44 genótipos de cebola pertencentes aos programas de melhoramento genético de cebola da Embrapa Hortaliças e do Instituto Agrônômico de Pernambuco foram inoculados com o isolado mais agressivo de cada espécie, sendo selecionados 28 genótipos resistentes a *B. cenocepacia* e 23 genótipos a *B. orbicola*. Posteriormente, os três isolados mais agressivos de cada espécie foram inoculados em bulbos de cebola dos genótipos selecionados, sendo observado que 15 genótipos se mantiveram resistentes a *B. cenocepacia* e 9 genótipos a *B. orbicola*, enquanto os genótipos Baia Periforme Agro-ceres, Beta Cristal, BRS Rio Verde, Crioula Mercosul, IPA 7, Primeiro e Rainha mantiveram-se estáveis para ambas as espécies, indicando a presença de genes com potencial para serem explorados em programas de melhoramento visando à obtenção de variedades de cebola resistentes a doença. A reação ao cobre foi avaliada submetendo-se os três isolados mais agressivos de cada espécie a soluções

de sulfato de cobre nas concentrações de 0, 100, 200, 300 e 400 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Não foi observado crescimento bacteriano a partir da concentração de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Os tratamentos nas concentrações de 300 e 400 mg.L⁻¹ de Cu²⁺ foram plaqueados em meio de cultura NYDA e inoculados em catafilos de cebola comerciais, sendo observado o crescimento bacteriano em placa e os sintomas característicos da doença nos catafilos inoculados, demonstrando uma ação bacteriostática do cobre. Posteriormente, suspensões de 18 isolados de *B. cenocepacia* e 45 isolados de *B. orbicola* foram inoculadas em placas de Petri contendo meio mínimo acrescido de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺, não sendo observado crescimento bacteriano. Conclui-se que 7 genótipos de cebola apresentaram níveis satisfatórios de resistência a *B. cenocepacia* e *B. orbicola*, e que o cobre apresentou atividade bacteriostática sobre essas espécies a partir da concentração de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺.

Palavras-chave: *Allium cepa*, resistência genética, controle químico.

ABSTRACT

Onion (*Allium cepa* L.) is subject to several diseases of different etiologies, being sour skin, caused by species from the *Burkholderia cepacea* complex (BCC), one of the most important diseases for onion cultivation. Among the BCC species, *B. cenocepacia*, *B. orbicola*, *B. semiarida*, and *B. sola* have recently been associated with disease in northeastern Brazil, with a predominance of *B. cenocepacia* and *B. orbicola*, in this region. Given the above, this study aimed to select onion genotypes resistant to *B. cenocepacia* and *B. orbicola*, and to evaluate the reaction isolates of these species to copper. Initially, 9 isolates of *B. cenocepacia* and 10 isolates of *B. orbicola* were inoculated into commercial onion bulbs to determine the levels of aggressiveness. Then, bulbs of 44 onion genotypes belonging to the onion genetic improvement programs of Embrapa Hortaliças and Instituto Agronômico de Pernambuco were inoculated with the most aggressive isolate of each species, selecting 28 genotypes resistant to *B. cenocepacia* and 23 genotypes to *B. orbicola*. Subsequently, the three most aggressive isolates of each species were inoculated into onion bulbs of the selected genotypes, and it was observed that 15 genotypes remained resistant to *B. cenocepacia* and 9 genotypes to *B. orbicola*, while the genotypes Baia Periforme Agro-ceres, Beta Cristal, BRS Rio Verde, Crioula Mercosul, IPA 7, Primeiro and Rainha remained stable for both species, indicating the presence of genes with potential to be explored in breeding programs aimed at obtaining disease-resistant onion varieties. The reaction to copper was evaluated by submitting the three most aggressive isolates

of each species to copper sulfate solutions at concentrations of 0, 100, 200, 300 and 400 mg.L⁻¹ of Cu²⁺. No bacterial growth was observed from the concentration of 300 mg.L⁻¹ of Cu²⁺. The treatments at concentrations of 300 and 400 mg.L⁻¹ of Cu²⁺ were plated in NYDA culture medium and inoculated in commercial onion cataphylls, observing bacterial growth in plaque and the characteristic symptoms of the disease in the inoculated cataphylls, demonstrating an action copper bacteriostatics. Subsequently, suspensions of 18 *B. cenocepacia* isolates and 45 *B. orbicola* isolates were inoculated in Petri dishes containing minimal medium plus 300 mg.L⁻¹ of Cu²⁺, with no bacterial growth being observed. It was concluded that 7 onion genotypes showed satisfactory levels of resistance to *B. cenocepacia* and *B. orbicola*, and that copper showed bacteriostatic activity on these species from the concentration of 300 mg.L⁻¹ of Cu²⁺.

Keywords: *Allium cepa*, sour skin, genetic resistance, chemical control.

A cebola, *Allium cepa* L., é uma das mais antigas hortaliças cultivadas e de maior difusão pelo mundo (Barbieri 2008; Oliveira *et al.* 2009), sendo caracterizada como a espécie mais importante do gênero *Allium* devido ao volume de produção e valor econômico (Resende & Costa 2007). A produção mundial de cebola no ano de 2021 foi de aproximadamente 106,6 milhões de toneladas, sendo as maiores produções registradas na Índia e China, que juntos correspondem a mais de 47,6% da produção mundial para o referido ano (FAO 2023). O Brasil atingiu uma produção de 1.640.628 toneladas, sendo a região Nordeste responsável pela produção de 329.682 toneladas, com destaque para o estado da Bahia, que produziu 260.399 toneladas, e Pernambuco, com uma produção de 61.739 toneladas, que juntos são responsáveis por 97,7% da produção regional (IBGE 2023).

A cultura da cebola pode ser comprometida por inúmeras podridões bacterianas, seja no campo ou na fase de pós-colheita (Gava & Tavares 2007; Silva *et al.* 2018). Dentre essas doenças, a podridão bacteriana das escamas destaca-se como um dos principais problemas da cebolicultura, pois ocorre de forma generalizada e pode causar perdas de até 50% da produção (Wordell Filho & Boff 2006; Silva *et al.* 2018). A primeira ocorrência mundial da doença foi realizada no estado de Nova York no ano de 1950 e originalmente relatada por Walter Burkholder, sendo denominada de “sour skin”, devido ao seu característico odor avinagrado (Burkholder 1950). No Brasil, a doença é chamada de camisa d’água ou podridão bacteriana das escamas pelo fato da deterioração está restrita às escamas mais externas dos bulbos (Burkholder 1950; Silva *et al.* 2018).

As principais espécies associadas a podridão bacteriana das escamas pertencem ao complexo *B. cepacia* (CBC) (Silva *et al.* 2018), que abriga um conjunto formado por 24 espécies estreitamente relacionadas (Eberl & Vandamme 2016; Morales-Ruíz *et al.* 2022), apresentando alta similaridade nas sequências dos genes 16S rDNA (98-100%) e *recA* (94-95%), com moderada hibridização DNA-DNA (30-50%) (Coenye *et al.* 2001) e identidade de nucleotídeos (average nucleotide identity - ANI) do genoma abaixo de 90% (Peeters *et al.* 2016), sendo caracterizadas como versáteis patógenos de plantas, saprófitas, agentes de biocontrole, agentes de biorremediação e patógenos oportunistas de humanos (Parke 2000). Dentre as espécies do CBC, apenas *B. cenocepacia* (Oliveira *et al.* 2017), *B. orbicola* (Morales-Ruíz *et al.* 2022), *B. semiarida* e *B. sola* (Velez 2021) tem sido detectadas causando a podridão bacteriana das escamas da cebola no semiárido nordestino (Oliveira *et al.* 2017; Oliveira *et al.* 2019; Baia *et al.* 2021; Velez 2021).

O uso de cultivares resistentes é caracterizado como o método mais eficiente, econômico e ambientalmente seguro para o controle de doenças de plantas, pois permite a redução significativa da aplicação de agroquímicos e a associação com outras práticas de manejo para o controle efetivo de doenças (Camargo 2011). Além disso, a utilização de cultivares resistentes atende a crescente pressão dos consumidores para a produção de alimentos saudáveis a partir de atividade não danosa a natureza (Santos *et al.* 2013). Nesse contexto, o melhoramento genético de cebola na região Nordeste tem sido executado ininterruptamente desde o ano de 1972, contemplando cebolas roxas e amarelas, com o objetivo de desenvolver cultivares dotadas de elevado potencial produtivo, nível elevado de tolerância aos principais problemas fitossanitários da região, bem como uma melhor conservação pós-colheita, pungência moderada e a boa adaptação às condições ambientais locais (Costa *et al.* 1999; Souza *et al.* 2008). No entanto, apesar da significativa importância da podridão bacteriana das escamas, ainda não existe registro de cultivares comprovadamente resistentes a doença. Contudo, estudos recentes demonstraram que sete genótipos de cebola apresentaram tolerância a isolados de *B. gladioli* pv. *alliicola* (Velez *et al.* 2020), agente causal da podridão escorregadia da cebola (Burkholder 1942). Portanto, é alta a probabilidade de alguns desses genótipos também se comportarem de forma tolerante ou resistente às espécies associadas a podridão bacteriana das escamas na região Nordeste.

Além do uso de cultivares resistentes, o cobre também tem sido utilizado para a proteção do tecido vegetal contra infecção por bactérias (Bondarczuk & Piotrowska-Seget 2013; Leite Júnior 2000). Nesse contexto, aplicações regulares de produtos cúpricos têm sido adotadas entre as principais práticas de manejo integrado para o controle de doenças bacterianas (Leite Júnior

2000; Silva 2017). No entanto, aplicações contínuas podem conferir resistência de modo a comprometer a eficácia do cobre (Behlau *et al.* 2013), como recentemente demonstrado para *B. gladioli* (Serret-Lopez *et al.* 2021). Além disso, considerando que espécies do complexo *B. cepacia* são altamente resistentes a vários metais pesados, sendo frequentemente isolados de solos ácidos onde a biodisponibilidade de cobre é alta (Silva *et al.* 2018; Higgins *et al.* 2020), torna-se evidente a necessidade de estudos que visem a caracterização do comportamento das espécies associadas a doença em relação ao cobre. Portanto, este estudo teve como objetivos selecionar genótipos de cebola resistentes à podridão bacteriana das escamas causada por isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* e avaliar a reação desses isolados ao cobre.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados, condições de cultivo e preparo de suspensão

Dezoito isolados de *B. cenocepacia* e 45 isolados de *B. orbicola*, provenientes de campos de produção de cebola da região semiárida do Nordeste do Brasil e com perfis bioquímico, fisiológico, molecular e filogenético previamente caracterizados (Oliveira *et al.*, 2019; Baia *et al.*, 2021), foram obtidos na Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), e reativados a partir de preservações em água destilada esterilizada (ADE). Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Trypan Blue Tetracycline - TBT (Hagedorn *et al.* 1987), sendo estas incubadas em Biochemical Oxygen Demand (B.O.D) a temperatura de 30° C, durante 48 horas.

Para o preparo de suspensões bacterianas, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio NYDA e incubadas em B.O.D a temperatura de 30° C, por 36 horas. As suspensões bacterianas foram preparadas em ADE e as concentrações ajustadas com o auxílio de um fotocolorímetro (Analyser 500 M, Brasil) para 10^8 UFC mL⁻¹. Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados em duplicata e cada espécie foi analisada individualmente.

Análise da agressividade dos isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola*

A análise da agressividade foi realizada para 9 isolados de *B. cenocepacia* e 10 isolados *B. orbicola*, caracterizados em estudos anteriores como os mais agressivos da referida coleção

(Baia *et al.* 2021). Catafilos provenientes de bulbos de cebola “classe 2” (35 – 50 mm de diâmetro), adquiridos no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA-PE), foram cortados e dispostos sobre placas de Petri identificadas, sendo posteriormente feridos a uma profundidade de aproximadamente 2,5 mm com o auxílio de alfinetes entomológicos, e depositados 10 µL das suspensões bacterianas dos isolados sobre o ferimento. As placas foram acomodadas em bandejas plásticas forradas com folhas de papel toalha embebidas com 80 mL de ADE, sendo recobertas com sacolas plásticas transparentes para criação de uma câmara úmida e incubadas à temperatura de 30° C durante 48 horas. Catafilos tratados similarmente com ADE constituíram o controle negativo. As avaliações foram realizadas às 48 h medindo-se o diâmetro da lesão em dois sentidos opostos com o auxílio de um paquímetro digital. Os três isolados caracterizados como os mais agressivos de cada espécie foram selecionados para fins de realização dos experimentos descritos a seguir.

Seleção de genótipos de cebola resistentes a *B. cenocepacia* e *B. orbicola*

Quarenta e quatro genótipos de cebola pertencentes aos programas de melhoramento genético da cebola da Embrapa Hortaliças e do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) foram inoculados, em experimentos distintos, com o isolado mais agressivo de *B. cenocepacia* e *B. orbicola*, respectivamente. Bulbos sadios de cebola, produzidos na estação experimental do IPA em Belém do São Francisco-PE, compreendendo as “classes 2, 3 e 4” (35 – 90 mm de diâmetro), foram inoculados com o isolado CCRMBC 157 de *B. cenocepacia* e o isolado CCRMBC 60 de *B. orbicola*.

O procedimento de inoculação consistiu na remoção dos catafilos externos, sendo os bulbos posteriormente acomodados, feridos, inoculados, identificados e incubados conforme descrição anterior. Bulbos tratados similarmente com ADE constituíram o controle negativo. As avaliações foram realizadas a cada 60 minutos visando a determinação do período de incubação, caracterizado como o tempo compreendido entre a inoculação do patógeno e o aparecimento do primeiro sintoma (Vanderplank 1963), e às 48 horas após as inoculações, para determinação da severidade, conforme descrito anteriormente.

Avaliação da estabilidade da resistência de genótipos de cebola a *B. cenocepacia* e *B. orbicola*

Bulbos de cebola compreendendo as “classes 2, 3 e 4” (35 – 90 mm de diâmetro) dos genótipos Alfa São Francisco, Alvorada, Baia Periforme Agro-ceres, Baia Periforme Super Precoces, Beta Cristal, Bola Precoces, Brisa Verão IPA 13, BRS Rio Verde, Campo Lindo, Carrancas, Conquista, Crioula Mercosul, H9, IPA 6, IPA 7, Jubileu, Juporanga, Leona, Optima PF, Pérola, Primeiro, Poliana, Pop. Exp. VCE, Rainha, Ruiva, São Paulo, Serrana e Vale Ouro IPA 11 foram inoculados com os isolados CCRMBC 157, CCRMBC 55 e CCRMBC 61 de *B. cenocepacia*, enquanto bulbos dos genótipos Alvorada, Baia do Cedo, Baia Periforme Agro-ceres, Baia Periforme Super Precoces, Beta Cristal, Bola Precoces, Brisa Verão IPA 13, BRS Rio Verde, Campo Lindo, Carrancas, Conquista, Crioula Mercosul, Imperatriz, IPA 6, IPA 7, IPA 9, Jubileu, Optima PF, Primeiro, Rainha, Ruiva, São Paulo e Serrana foram inoculados com os isolados CCRMBC 60, CCRMBC 67 e CCRMBC 27 de *B. orbicola*. Os procedimentos de inoculação, incubação e avaliações foram realizadas conforme descritos anteriormente.

Determinação da concentração mínima inibitória de cobre a isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola*

Soluções de sulfato de cobre (ICO) P.A – A.C.S. (Synth, Diadema, SP, Brasil) foram testadas como fonte de íons de cobre (Cu^{2+}) nas concentrações finais de 0, 100, 200, 300 e 400 mg.L^{-1} de Cu^{2+} . As soluções nas respectivas concentrações foram preparadas em água destilada e esterilizadas por filtração em membrana milipore de 0,22 μm . A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada para os isolados CCRMBC 157, CCRMBC 55 e CCRMBC 61 de *B. cenocepacia* e CCRMBC 60, CCRMBC 67 e CCRMBC 27 de *B. orbicola* em microplacas de microtitulação mediante o cultivo em meio Luria-Bertani (Sezonov *et al.* 2007). Os tratamentos para as diferentes concentrações de cobre foram constituídos de 100 μL de meio de cultura, acrescidos a 100 μL de solução de sulfato de cobre para as respectivas concentrações, e 10 μL das suspensões bacterianas. O controle positivo foi constituído por meio de cultura, ADE e suspensão bacteriana, enquanto o controle negativo foi constituído por meio de cultura, diferentes concentrações de sulfato de cobre e ADE. As microplacas foram identificadas e incubadas em B.O.D. à temperatura de 30° C, durante 48 horas. O experimento foi conduzido com sete repetições para cada tratamento e as avaliações foram realizadas mediante a observação visual da presença e ausência de crescimento bacteriano às 48 h.

Para determinar a ação do cobre sobre os isolados, catafilos provenientes de bulbos de cebola obtidos no CEASA-PE foram feridos, inoculados e incubados conforme descrito anteriormente. As inoculações foram realizadas utilizando-se 10 µL dos tratamentos nas concentrações de 0, 300 e 400 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Paralelamente, foram transferidos e plaqueados 100 µL dos respectivos tratamentos para placas de Petri contendo meio NYDA. Placas e bandejas foram posteriormente acomodadas para incubação em B.O.D. à temperatura de 30°C durante 48 horas. As avaliações foram realizadas visando a determinação da incidência da doença e da ação bactericida ou bacteriostática do cobre sobre os isolados, mediante a observação visual da manifestação de sintomas característicos da podridão bacteriana das escamas nos catafilos de cebola e da presença ou ausência de crescimento bacteriano em placa.

Sensibilidade de isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* ao cobre *in vitro*

A sensibilidade ao cobre foi analisada para a coleção de 18 isolados de *B. cenocepacia* e 45 isolados de *B. orbicola* pertencentes a CCRM sob concentração de íons de cobre caracterizada como mínima inibitória. O ensaio foi conduzido em placas de Petri contendo meio de cultura para sais minerais de baixa complexidade (CYE - 1,7 g de casitona, 0,35 g de extrato de levedura, 2 g de glicerol e 15 g de ágar nutritivo) (Andersen *et al.* 1991), acrescido de sulfato de cobre na concentração de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Alíquotas de 20 µL das suspensões bacterianas foram depositadas em quatro pontos equidistantes sobre a superfície do meio de cultura, caracterizando o número de repetições para cada isolado. O controle negativo foi constituído de uma alíquota de 20 µL de ADE depositada ao centro da placa. O controle positivo foi constituído de inoculações similares em meio CYE sem o sulfato de cobre. As placas foram cuidadosamente incubadas em B.O.D., a temperatura de 30 °C, por 48 horas. As avaliações foram realizadas verificando-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano confluyente, equivalente ao crescimento esperado no meio CYE sem sulfato de cobre.

Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado para determinação da agressividade dos isolados e seleção de genótipos resistentes, sendo realizados com cinco repetições por tratamento (isolado), e cada repetição constituída por um catafilo ou bulbo de cebola contendo um ponto de inoculação. Os experimentos para avaliação da estabilidade da resistência foram conduzidos em arranjo fatorial (isolados X genótipos) com

quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um bulbo de cebola. A caracterização da atividade do cobre foi realizada através de ensaios *in vivo* compreendo seis repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um catafilo de cebola, e *in vitro* a partir de plaqueamentos compreendo duas repetições para cada tratamento.

Os dados obtidos foram avaliados como repetições no tempo. Os pressupostos da análise de variância (ANOVA) foram checados pelos Testes de Levene e Shapiro-Wilk com o auxílio do programa Statistix (v. 9.0. Tallahassee, Flórida, Estados Unidos). As médias do período de incubação e da severidade da doença foram agrupadas pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do software estatístico Sisvar (v. 5.6) (Ferreira 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da agressividade dos isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola*

Os isolados CCRMBC 157, CCRMBC 55, CCRMBC 61, CCRMBC 199, CCRMBC 02, CCRMBC 21 e CCRMBC 56 de *B. cenocepacia* (Tabela 1) apresentaram os maiores níveis de agressividade, não diferindo entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), enquanto os isolados CCRMBC 99 e CCRMBC 147 se mostraram menos agressivos. A amplitude da agressividade entre o isolado mais agressivo (CCRMBC 157) e os menos agressivos (CCRMBC 147 e CCRMBC 99 e) foi de 12,39 mm.

Diferentes níveis de agressividade foram observados entre os isolados de *B. orbicola* (Tabela 2). Os isolados CCRMBC 60 e CCRMBC 67 apresentaram os maiores níveis de agressividade e não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), enquanto os isolados CCRMBC 27, CCRMBC 65, CCRMBC 103, CCRMBC 23, CCRMBC 196, CCRMBC 31 e CCRMBC 18 apresentaram níveis intermediários. Por sua vez, o isolado CCRMBC 109 se mostrou menos agressivo. A amplitude da agressividade entre o isolado mais agressivo (CCRMBC 60) e o menos agressivo (CCRMBC 109) foi de 23,4 mm.

Os isolados CCRMBC 157, CCRMBC 55 e CCRMBC 61 de *B. cenocepacia* e os isolados CCRMBC 60, CCRMBC 67 e CCRMBC 27 de *B. orbicola* foram selecionados com base nos seus respectivos resultados quanto a severidade, sendo caracterizados como os três isolados mais agressivos de cada espécie para fins de uso nos diferentes ensaios realizados no presente estudo.

Comportamento semelhante foi observado entre os isolados do complexo *B. cepacia* relacionados a podridão em bulbos de cebolas no semiárido brasileiro, sendo identificados

diferentes níveis de severidade (Baia *et al.* 2021) atrelado ao baixo período de incubação do patógeno, compreendido entre 7 e 16 horas (Oliveira *et al.* 2017), apontando para a rápida atividade de colonização e maceração dos tecidos dos bulbos de cebola (Velez 2017). Por esse motivo, optou-se pela utilização da severidade e período de incubação no presente estudo.

Seleção de genótipos de cebola resistentes a *B. cenocepacia* e *B. orbicola*

Diferentes níveis de resistência a podridão bacteriana das escamas foram observados entre os 44 genótipos de cebola inoculados artificialmente com os isolados CCRMBC 157 e CCRMBC 60, considerados como o mais agressivo de *B. cenocepacia* e *B. orbicola*, respectivamente. Nenhum dos 44 genótipos testados apresentou reação imune (ausência de doença) aos isolados das referidas espécies (Tabela 3). O período de incubação (PI) e a severidade variaram de 9 a 13,8 horas e 7,6 a 12,8 horas e de 5,47 a 15,85 mm e 6,49 a 23,03 mm para os isolados CCRMBC 157 e CCRMBC 60, respectivamente.

A análise da severidade nos bulbos inoculados com o isolado CCRM 157 apontou 28 genótipos resistentes, (5,47 a 9,90 mm), 12 moderadamente resistentes (10,17 a 12,36 mm) e 4 suscetíveis (13,59 a 15,85 mm), enquanto para o isolado CCRMBC 60 foram apontados 23 genótipos resistentes (6,49 a 12,50 mm), 17 moderadamente resistentes (12,29 a 14,75 mm), 3 suscetíveis (16,66 a 17,37 mm), e apenas 1 altamente suscetível (23,03 mm). Os genótipos Alvorada, Baia Periforme Agro-ceres, Baia Periforme Super Precoce, Beta Cristal, Bola Precoce, Brisa Verão IPA 13, BRS Rio Verde, Conquista, Campo lindo, Carrancas, Crioula Mercosul, IPA 6, IPA 7, Jubileu, Optima PF, Primeiro, Rainha, Ruiva, Serrana e São Paulo apresentaram-se resistentes aos isolados de ambas as espécies.

Comportamento parecido foi observado por Velez *et al.* (2020) ao selecionar genótipos de cebola resistentes à *B. gladioli* pv. *alliicola*, sendo apontados genótipos considerados como resistentes, moderadamente resistente e suscetível a podridão escorregadia das escamas, com proporções compreendidas em 58,62%, 36,21% e 5,17%, respectivamente. Os genótipos Conquista e Rainha, apontados como resistentes à *B. gladioli* pv. *alliicola*, também se comportaram como resistentes aos isolados CCRMBC 157 de *B. cenocepacia* e CCRMBC 60 de *B. orbicola* no atual estudo. Entretanto, o genótipo ‘Régia’, cujo desempenho produtivo atrelado a sua moderada resistência à mancha púrpura o caracteriza como um dos mais promissores para a região do Submédio do Vale do São Francisco (Souza *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2016), apresentou-se suscetível às espécies analisadas no presente estudo, sendo este

comportamento semelhantemente ao observado por Velez *et al.* (2020) quanto à *B. gladioli* pv. *alliicola* (Figura 1).

Avaliação da estabilidade da resistência de genótipos de cebola a *B. cenocepacia* e *B. orbicola*

Não foi observada interação entre isolados e genótipos para o PI e a severidade, para ambas as espécies. Diferenças significativas foram observadas apenas para os genótipos, sendo estes analisados individualmente.

Foram caracterizados 15 genótipos (Alvorada, Baia Periforme Agro-ceres, Beta Cristal, Bola Precoce, Brisa Verão IPA 13, BRS Rio Verde, Campo lindo, Carrancas, Crioula Mercosul, IPA 6, IPA 7, Jubileu, Primeiro, Rainha, São Paulo e Vale Ouro IPA 11) como resistentes aos três isolados mais agressivos de *B. cenocepacia* (CCRMBC 157, CCRMBC 55 e CCRMBC 61) (Tabela 4), enquanto 9 genótipos (Baia Periforme Agro-ceres, Baia Periforme Super Precoce, Beta Cristal, BRS Rio Verde, Crioula Mercosul, IPA 7, Primeiro, Rainha e Ruiva) foram caracterizados como resistentes aos isolados mais agressivos de *B. orbicola* (CCRMBC 60, CCRMBC 67 e CCRMBC 27) (Tabela 5).

Os genótipos Baia Periforme Agro-ceres, Beta Cristal, BRS Rio Verde, Crioula Mercosul, IPA 7, Primeiro e Rainha mantiveram-se estáveis quanto ao padrão de resistência a *B. cenocepacia* e *B. orbicola*. O comportamento observado indica a presença fontes promissoras de resistência a podridão bacteriana das escamas, podendo ser posteriormente explorados em programas de melhoramento genético de plantas visando à obtenção de variedades de cebola resistentes a doença.

Determinação da concentração mínima inibitória de cobre a isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola*

Respostas idênticas de sensibilidade as diferentes concentrações de cobre foram observadas para os isolados CCRMBC 157, CCRMBC 55 e CCRMBC 61 de *B. cenocepacia* e CCRMBC 60, CCRMBC 67 e CCRMBC 27 de *B. orbicola* (Tabela 6). Os isolados de ambas as espécies, tratados com sulfato de cobre nas concentrações de 0, 100 e 200 mg.L⁻¹ de Cu²⁺, apresentaram crescimento de aspecto opaco semelhante ao apresentado pelo controle positivo. A completa ausência de crescimento bacteriano foi observada a partir da concentração de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺, sendo caracterizada como a concentração mínima inibitória, para fins de uso

em posterior ensaio de sensibilidade ao cobre abrangendo a coleção de isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* pertencentes a CCRM.

Comportamento análogo de inibição de crescimento foi observado por Ansari *et al.* (2019) em isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* (anteriormente denominadas como linhagens IIIA e IIIB de *B. cenocepacia*, respectivamente), relacionadas a podridão digital da banana no Sudeste do Irã, quando submetidos a concentrações de sulfato de cobre superiores a 200 mg.L⁻¹. Segundo Fleming e Trevors (1989), em concentrações mais altas, o cobre atua como um biocida de amplo espectro devido à sua interação com ácidos nucleicos, rompimento de sítios ativos de enzimas, interferência com o sistema de transporte de energia e, finalmente, interferindo na integridade das membranas celulares, justificando o resultado obtido.

Diferentes respostas foram observadas entre os catafilos de cebola inoculados com os isolados CCRMBC 157, CCRMBC 55 e CCRMBC 61 de *B. cenocepacia* e os isolados CCRMBC 60, CCRMBC 67 e CCRMBC 27 de *B. orbicola* sob a ação do sulfato de cobre nas concentrações de 300 e 400 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Sintomas de podridão bacteriana das escamas foram observados em 50% dos catafilos inoculados com os isolados CCRMBC 55 e CCRMBC 61 de *B. cenocepacia* e o isolado CCRMBC 60 de *B. orbicola* sob a ação de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Resultado similar foi observado para o isolado CCRMBC 157 de *B. cenocepacia*, sob a ação de 400 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Sintomas característicos foram igualmente observados em 50% dos catafilos inoculados com o isolado CCRMBC 67 de *B. orbicola* sob a ação de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺, e em sua totalidade para aqueles inoculados com o referido isolado sob ação de 400 mg.L⁻¹ de Cu²⁺. Não foi observada a manifestação de sintomas quanto as inoculações referentes ao isolado CCRMBC 27 de *B. orbicola*.

Os resultados obtidos do plaqueamento foram coerentes com aqueles observados nas inoculações, havendo crescimento bacteriano apenas para as respectivas repetições dos isolados CCRMBC 157, CCRMBC 55 e CCRMBC 61 de *B. cenocepacia* e os isolados CCRMBC 60 e CCRMBC 67 de *B. orbicola* sob a ação do sulfato de cobre nas concentrações de 300 e 400 mg.L⁻¹ de Cu²⁺, correspondentes aquelas as quais foram observadas causando sintomas da podridão bacteriana das escamas em catafilos de cebola. O comportamento observado aponta para atividade bacteriostática do sulfato de cobre sobre ambas as espécies bacterianas em concentrações superiores a 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺ (Figura 2).

Sensibilidade dos isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* ao cobre *in vitro*

O comportamento observado para os 18 isolados de *B. cenocepacia* e 45 isolados de *B. orbicola* quando cultivados em meio CYE acrescido de sulfato de cobre na concentração de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺, foi coerente com o comportamento apresentado pelos isolados CCRMBC 157, CCRMBC 55 e CCRMBC 61 de *B. cenocepacia* e os isolados CCRMBC 60, CCRMBC 67 e CCRMBC 27 de *B. orbicola* em ensaio que determinou a concentração mínima inibitória do cobre para as referidas espécies, não sendo observado o crescimento de nenhum dos isolados usados no ensaio sob as condições descritas.

Aplicações regulares de produtos cúpricos registrados no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), têm sido adotadas entre as principais práticas de manejo visando o controle de doenças de etiologia fúngica na cultura da cebola (Pereira *et al.*, 2014), a exemplo do mal-de-sete-voltas (*Collectotrichum gloeosporioides*) e a mancha púrpura (*Alternaria porri* ELL.), caracterizados como alguns dos principais problemas fitossanitários da cebolicultura no Nordeste do Brasil (SOUZA *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2014). Apesar da inexistência de produtos registrados para uso no controle da podridão bacteriana das escamas em cebola, o comportamento apresentado pelos isolados de *B. cenocepacia* e *B. orbicola* ao cobre sob condições *in vitro*, corrobora para a capacidade de retardamento do processo infeccioso das referidas espécies bacterianas quando expostas a determinadas concentrações de íons de cobre, podendo contribuir para as práticas de manejo preventivo da doença em campos de produção de cebola na região semiárida do nordeste brasileiro, dado o uso regulamentado de produtos cúpricos para o controle de doenças fúngicas na referida cultura,

Análises *in vivo* são sugeridas para a elucidação da interação dos respectivos patógenos com o hospedeiro sob a ação do cobre, e para identificar possíveis efeitos negativos, diretos e indiretos, relacionados a fitotoxicidade, resistência, efeito sobre a biota do solo e impacto nos parâmetros de qualidade do produto comercial.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. 2005. *Plant pathology*. 5th ed., New York, EUA: Academic press. 922 p.

- 436 AGROFIT. 2023. *Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários*. Available at:
 437 http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em fevereiro
 438 18, 2023.
- 439 AMORIM, L. 1995. Avaliação de doenças. In: *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*.
 440 3. ed. São Paulo, BR: Ceres. p. 647–671.
- 441 ANDERSEN, GL; MENKISSOGLOU, O; LINDOW, SE. 1991. Occurrence and properties of
 442 copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California.
 443 *Phytopathology* 81(6): 646 – 656.
- 444 ANSARI, M; TAGHAVI, SM.; ZAREI, S; MIRI, K; PORTIER, P; OSDAGHI, E. 2019.
 445 Pathogenicity and molecular phylogenetic analysis reveal a distinct position of the banana
 446 fingertip rot pathogen among the *Burkholderia cenocepacia* genomovars. *Plant Pathology*
 447 68(4): 804-815.
- 448 BARBIERI, RL. 2008. Cebola. In: BARBIERI, RL; STUMPF, ERT. *Origem e evolução de*
 449 *plantas cultivadas*. Brasília, BR: Embrapa Informação Tecnológica. p. 253-266.
- 450 BEHLAU, F; HONG, JC; JONES, JB; GRAHAM, JH. 2013. Evidence for acquisition of copper
 451 resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. *Phytopathology*
 452 103(5):18-409.
- 453 BONDARCZUK, K; PIOTROWSKA-SEGET, Z. 2013. Molecular basis of active copper
 454 resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biology and Toxicology* 29(6):397-
 455 405.
- 456 BURKHOLDER, WH. 1942. Three bacterial plant pathogens: *Phytomonas earyophylli* sp.n.,
 457 *Phytomonas alliicola* sp.n., and *Phytomonas manihotis* (Arthaud-Berthet et Sondar)
 458 Viégas. *Phytopathology* 32:141-149.
- 459 BURKHOLDER, WH. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*
 460 40(1):115-117.
- 461 CAMARGO, LEA. 2011. Controle Genético. In: AMORIM, L; REZENDE, JAM;
 462 BERGAMIN FILHO, A. (eds). *Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos*. São Paulo,
 463 BR: Agronômica Ceres. p.325-340.
- 464 CAMPBELL, CL; MADDEN, LV. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. New
 465 York, EUA: John Wiley & Sons. 532 p.
- 466 COSTA, ND.; CANDEIA, JA.; ARAUJO, MT. 1999. Importância econômica e melhoramento
 467 da cebola no Nordeste do Brasil. In: QUEIRÓZ, MA; GOEDERT, CO.; RAMOS, SRR., ed.
 468 *Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro*. Petrolina, BR:
 469 Embrapa Semi-Árido, p. 398-414.

- EBERL, L; VANDAMME, P. 2016. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research* 5: 1007-1017.
- FERREIRA, DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Introduction to plant disease epidemiology* 35:1039-1042.
- FLEMMING, CA.; TREVORS, JT. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, air, and soil pollution* 44:143-158.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Statistics division*. 2023. Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acessado em fevereiro 17, 2023.
- GARCÍA-HORSMAN, JA.; BARQUERA, B; RUMBLEY, J; MA, J; GENNIS, RB. 1994. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *Journal of Bacteriology* 176(18): 600-5587.
- GAVA, CAT; TAVARES, SCCH.; 2007. Doenças. In: COSTA, ND; RESENDE, GM. de (Ed.). *Cultivo de cebola no Nordeste*. Embrapa Semi-Árido, 2007. Available at: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/162405/1/Cultivodacebola.pdf>. Acessado em fevereiro 18, 2023.
- HAGEDORN C; GOULD WD; BARDINELLI TR; GUSTAVSON DR. 1987. A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2265-2268.
- HIGGINS, S; GUALDI, S; PINTO-CARBÓ, M; EBERL, L. 2020. Copper resistance genes of *Burkholderia cenocepacia* H111 identified by transposon sequencing. *Environmental Microbiology Reports* 12(2): 241-249.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Estatística da Produção Agrícola*, 2023. Available at: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cebola/br>. Acessado em fevereiro 17, 2023.
- KILL, LHP; RESENDE, GM; SOUZA, RJ. 2007. Botânica. In: COSTA, ND; RESENDE, GM. (Ed.). *Cultivo de cebola no Nordeste*. Embrapa Semi-Árido, Available at: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/162405/1/Cultivodacebola.pdf>. Acessado em fevereiro 17, 2023.
- LEITE JÚNIOR, RP. 2000. Surviving with Citrus Canker in Brazil. Proceedings, 9th Congress of the International Society for Citriculture. Orlando, EUA. p. 890-896.
- LPSN. *List Of Prokaryotic Names With Standing In Nomenclature*. 2023. Available at: <https://lpsn.dsmz.de/> . Acessado em fevereiro 18, 2023.

- MORALES-RUIZ LM; RODRÍGUEZ-CISNEROS M; KERBER-DÍAZ J C; ROJAS-ROJAS FU; IBARRA JA; ESTRADA-DE LOS SANTOS P. 2022. *Burkholderia orbicola* sp. nov., a novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Archives of Microbiology* 204(3):178.
- OLIVEIRA, WJ. 2016. *Etiologia da podridão de escama da cebola no semiárido brasileiro*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 60 p (Dissertação de Mestrado)
- OLIVEIRA, WJ; SILVA, WA; SILVA, AMF; CANDEIA, JA; SOUZA, EB; MARIANO, RLR; GAMA, MAS. 2017. First report of *Burkholderia cenocepacia* causing sour skin of onion (*Allium cepa*) in Brazil. *Plant Disease* 101:1950.
- OLIVEIRA, WJ; SOUZA, EB; SILVA, AMF.; LIMA, NB; LEAL, CM; CANDEIA, JA; GAMA, MAS. 2019. Elucidating the etiology of onion bacterial scale rot in the semi-arid region of Northeastern Brazil. *Tropical Plant Pathology* 44(6):494-502.
- PEREIRA RB; OLIVEIRA VR; CARVALHO ADF.; PINHEIRO, JB. 2016. Reação de genótipos de cebola à mancha púrpura. *Horticultura Brasileira* 34:273-278.
- PEREIRA, RB; OLIVEIRA, VR; PINHEIRO, JB. 2014. *Diagnose e manejo de doenças fúngicas na cultura da cebola*. Brasília: Embrapa Hortaliças. 20p. (Circular Técnica, 133).
- RESENDE, GM; COSTA, ND. 2007. Socioeconomia. In: COSTA, ND.; RESENDE, GM (Ed.). *Cultivo de cebola no Nordeste*. Embrapa Semi-Árido, 2007. Available at: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/162405/1/Cultivodacebola.pdf>. Acessado em fevereiro 17, 2023.
- SANTO, CE; MORAIS, PV; GRASS, G. 2010. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. *Applied Environmental Microbiology* 76(5): 1341-1348.
- SANTOS, CAF.; OLIVEIRA, VR.; LEITE, DL. 2013. *Melhoramento genético de cebola no Brasil: avanços e desafios*. Petrolina: Embrapa Semiárido. 22 p. (Documentos, 254).
- SERRET-LOPEZ, M; ARANDA-OCAMPO, S; ESPINOSA-VICTORIA, D; ORTIZ-MARTINEZ, LE.; RAMÍREZ-RAZO, K. 2021. Caracterización polifásica de *Burkholderia gladioli* aislada de cebolla y evaluación de su patogenicidad potencial para otros cultivos. *Mexican Journal of Phytopathology*, 39(1):21-40
- SEZONOV, G; JOSELEAU-PETIT, D; D'ARI, R. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology* 189(23):8746-8749
- SILVA, EI. 2017. *Sensibilidade a cúpricos e estrutura genética de populações de Xanthomonas campestris pv. viticola*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 82p (Tese de Doutorado)

- SILVA, AMF; BAIA, ADB; VELEZ, LS; OLIVEIRA, WJ; GAMA, MAS. 2018. Diversidade taxonômica e patológica de espécies de *Burkholderia* causadoras de podridão das escamas da cebola. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 26: 81-95.
- SOUZA, JO; GRANGEIRO, LC; SANTOS, GM; COSTA, ND; SANTOS, CAF; NUNES, GHS. 2008. Avaliação de genótipos de cebola no Semi-Árido Nordeste. *Horticultura Brasileira* 26(1): 97-101.
- VANDERPLANK, JE. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. New York, EUA: Academic. 349 p.
- VELEZ, LS. 2017. *Seleção de genótipos de cebola resistentes à Burkholderia gladioli pv. alliicola*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 42 p. (Dissertação de Mestrado)
- VELEZ, LS; SILVA, AMF; SANTOS, CAF; ASSUNÇÃO, EF; SILVA, MS; SOUZA, EB; GAMA, MAS. 2020. Evaluation of onion genotypes to slippery skin caused by *Burkholderia gladioli* pv. *Alliicola*. *Horticultura Brasileira* 38(4): 350-355.
- VELEZ, LS. 2021. *Filogenômica e genômica comparativa de isolados de Burkholderia causadores de podridão das escamas da cebola*. Universidade Federal Rural de Pernambuco 99 p. (Tese de Doutorado em Fitopatologia)
- WORDELL FILHO, JA; BOFF, P. 2006. Doenças de origem parasitária. In: WORDELL FILHO, JA; ROWE, E; GONÇALVES, PAS.; DEBARBA, JF; BOFF, P; THOMAZELLI, LF. *Manejo fitossanitário da cebola*. Florianópolis, BR: EPAGRI. p. 19-162.

Tabela 1. Agressividade de isolados de *Burkholderia cenocepacia* em catáfilos de cebola artificialmente inoculados

Isolado	Severidade (mm) ¹
CCRMBC 157	21,35 a ²
CCRMBC 55	19,88 a
CCRMBC 61	19,18 a
CCRMBC 199	18,77 a
CCRMBC 02	18,45 a
CCRMBC 21	17,23 a
CCRMBC 56	14,88 a
CCRMBC 99	9,84 b
CCRMBC 147	8,96 b
CV(%)	20,77

Abreviaturas: CCRMBC, Coleção de Culturas Rosa Mariano de *Burkholderia cenocepacia*.

¹Severidade da doença baseada nas medições em milímetros do diâmetro da lesão em dois sentidos opostos.

²Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Agressividade de isolados de *Burkholderia orbicola* em catáfilos de cebola artificialmente inoculados

Isolado	Severidade (mm) ¹
CCRMBC 60	31,93 a ²
CCRMBC 67	30,59 a
CCRMBC 27	26,63 b
CCRMBC 65	22,63 b
CCRMBC 103	20,02 c
CCRMBC 23	18,84 c
CCRMBC 196	18,49 c
CCRMBC 31	15,86 c
CCRMBC 18	13,95 d
CCRMBC 109	8,53 e
CV(%)	17,34

Abreviaturas: CV, coeficiente de variação; CCRMBC, Coleção de Culturas Rosa Mariano de *Burkholderia cenocepacia*.

¹Severidade da doença baseada nas medições em milímetros do diâmetro da lesão em dois sentidos opostos.

²Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Avaliação de genótipos de cebola a podridão bacteriana das escamas causada por *Burkholderia cenocepacia* (CCRMBC 157) e *Burkholderia orbicola* (CCRMBC 60)

Genótipo	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (CCRMBC 157)			<i>Burkholderia orbicola</i> (CCRMBC 60)		
	Período de Incubação ¹	Severidade ³	Classe de resistência ⁴	Período de Incubação ¹	Severidade ³	Classe de resistência ⁴
Régia	11,40 b ²	15,85 a ²	S	9,60 b ²	23,03 a ²	AS
Texas						
Grano 24	11,60 b	15,33 a	S	11,60 a	12,88 c	MR
Texas						
Grano 5	12,00 a	15,06 a	S	11,20 a	17,37 b	S
Imperatriz	11,40 b	13,59 a	S	11,80 a	10,85 d	R
Henry's						
Special	11,20 b	12,36 b	MR	11,40 a	12,38 c	MR
Texas						
Grano 502	11,60 b	11,49 b	MR	11,20 a	14,34 c	MR
IPA 3	11,80 a	11,28 b	MR	9,00 b	13,59 c	MR
IPA 9	12,00 a	11,26 b	MR	11,40 a	11,93 d	R
Texas						
Grano 9	12,20 a	10,97 b	MR	10,20 b	17,21 b	S
Roxa do						
Barreiro	10,20 c	10,89 b	MR	9,40 b	16,66 b	S
IPA 2	11,60 b	10,79 b	MR	11,00 a	13,85 c	MR
Franciscan						
a IPA 10	10,00 c	10,64 b	MR	7,60 c	13,44 c	MR
BRS 367	12,60 a	10,55 b	MR	11,20 a	13,04 c	MR
Baia do						
Cedo	11,60 b	10,41 b	MR	10,40 b	10,91 d	R
Nomad	9,60 c	10,26 b	MR	9,80 b	14,75 c	MR
Primavera	12,20 a	10,17 b	MR	11,00 a	12,80 c	MR
São Paulo	12,20 a	9,90 c	R	12,40 a	10,88 d	R
IPA 6	10,60 b	9,85 c	R	11,20 a	11,15 d	R
Juporanga	13,00 a	9,69 c	R	11,20 a	12,29 c	MR
H9	12,40 a	9,34 c	R	11,80 a	13,61 c	MR
Conquista	12,40 a	9,25 c	R	11,20 a	10,94 d	R
Serrana	11,40 b	9,23 c	R	11,20 a	12,05 d	R
Rainha	12,40 a	9,18 c	R	12,60 a	7,95 d	R
Optima PF	13,00 a	9,08 c	R	11,20 a	11,17 d	R
Pop. Exp.						
VCE	9,00 c	9,00 c	R	8,00 c	13,72 c	MR
Vale Ouro						
IPA 11	12,40 a	8,97 c	R	11,00 a	12,40 c	MR
Ruiva	11,20 b	8,80 c	R	10,20 b	11,38 d	R
Baia						
Periforme						
Super	13,40 a	8,70 c	R	12,40 a	11,30 d	R
Precoce						
Bola						
Precoce	12,00 a	8,42 c	R	11,20 a	11,71 d	R

Crioula Mercosul	12,60 a	8,38 c	R	12,40 a	7,56 d	R
Pérola	12,00 a	8,17 c	R	10,80 a	13,30 c	MR
Alfa São Francisco	13,80 a	8,13 c	R	12,40 a	13,10 c	MR
Jubileu	12,20 a	8,09 c	R	12,20 a	9,25 d	R
Poliana	11,60 b	7,69 c	R	9,80 b	14,14 c	MR
Alvorada	12,80 a	7,65 c	R	11,40 a	10,84 d	R
Leona	9,80 c	7,44 c	R	10,60 a	13,88 c	MR
Carrancas	12,00 a	7,00 c	R	12,80 a	8,83 d	R
Primeiro Baia	13,00 a	6,72 c	R	12,20 a	9,82 d	R
Periforme	12,80 a	6,55 c	R	12,80 a	10,31 d	R
Agro-ceres						
BRS Rio Verde	10,80 b	6,25 c	R	11,20 a	6,49 d	R
Brisa						
Verão IPA 13	11,20 b	6,06 c	R	11,80 a	7,53 d	R
IPA 7	12,60 a	5,98 c	R	11,40 a	7,53 d	R
Beta						
Cristal	13,20 a	5,77 c	R	11,20 a	10,30 d	R
Campo Lindo	11,20 b	5,47 c	R	11,00 a	8,26 d	R
C.V. (%) =	12,83	31,77	-	14,47	32,09	-

Abreviaturas: CCRMBC, Coleção de Culturas Rosa Mariano de *Burkholderia cenocepacia*.

¹Período de incubação da doença baseado em horas. ²Média de cinco repetições. ³Severidade da doença baseada nas medições em milímetros do diâmetro da lesão em dois sentidos opostos. ⁴Classe de resistência: R (resistente), MR (Moderadamente resistente) e S (Suscetível). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

613 **Tabela 4.** Reação de genótipos de cebola a isolados de *Burkholderia cenocepacia*.

Genótipo	Período de Incubação ¹	Severidade ³	Classe de resistência ⁴
Leona	13,25 b ²	12,94 a ²	S
H9	9,00 c	12,05 a	S
Pop. Exp. VCE	14,58 a	11,82 a	S
Alfa São Francisco	10,92 c	11,78 a	S
Juporanga	10,00 c	11,76 a	S
Serrana	10,67 c	11,64 a	S
Conquista	10,50 c	11,46 a	S
Optima PF	10,83 c	11,01 a	S
Poliana	12,58 b	10,55 a	S
Ruiva	11,08 c	10,46 a	S
Baia Periforme Super Precoce	10,33 c	10,43 a	S
Pérola	12,42 b	10,31 a	S
São Paulo	10,50 c	10,67 a	S
Bola Precoce	10,67 c	9,97 b	R
IPA 6	12,92 b	9,92 b	R
Jubileu	11,25 c	9,72 b	R
Campo Lindo	11,92 c	9,61 b	R
Alvorada	10,92 c	9,53 b	R
Baia Periforme Agro-ceres	11,42 c	9,49 b	R
Vale Ouro IPA 11	15,25 a	9,47 b	R
Crioula Mercosul	12,83 b	9,35 b	R
Beta Cristal	11,42 c	9,05 b	R
Primeiro	11,58 c	9,04 b	R
Rainha	10,92 c	8,89 b	R
Carrancas	10,00 c	8,42 b	R
IPA 7	13,00 b	7,69 b	R
Brisa Verão IPA 13	11,00 c	7,55 b	R
BRS Rio Verde	13,33 b	6,50 b	R
C.V. (%) =	17,63	31,64	-

614 Abreviaturas: CCRMBC, Coleção de Culturas Rosa Mariano de *Burkholderia cenocepacia*.

615 ¹Período de incubação da doença baseado em horas. ²Média de quatro repetições. ³Severidade da doença baseada
 616 nas medições em milímetros do diâmetro da lesão em dois sentidos opostos. ⁴Classe de resistência: R (resistente).
 617 Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-
 618 Knott ($p \leq 0,05$).
 619

620

621

622

623

624

625 **Tabela 5.** Reação de genótipos de cebola a isolados de *Burkholderia orbicola*.

Genótipo	Período de Incubação ¹	Severidade ³	Classe de resistência ⁴
Campo Lindo	11,17 b	16,65 a ²	S
Imperatriz	8,83 c	15,10 a	S
IPA 9	9,92 c	13,77 b	MR
Conquista	9,75 c	13,73 b	MR
Jubileu	10,00 c	12,95 b	MR
Bola Precoce	9,83 c	12,90 b	MR
Optima PF	9,83 c	12,82 b	MR
IPA 6	13,75 a	12,79 b	MR
Baia do Cedo	10,58 c	12,79 b	MR
Serrana	9,25 c	12,76 b	MR
Brisa Verão IPA 13	11,67 b	12,66 b	MR
Alvorada	8,92 c	12,25 b	MR
São Paulo	10,50 c	12,25 b	MR
Carrancas	10,83 b	12,10 b	MR
Baia Periforme Agro-ceres	10,33 c	11,74 c	R
Crioula Mercosul	10,25 c	10,65 c	R
Primeiro	11,25 b	10,96 c	R
IPA 7	12,50 a	10,94 c	R
Baia Periforme Super Precoce	10,17 c	10,53 c	R
Beta Cristal	11,75 b	10,37 c	R
Rainha	11,17 b	10,06 c	R
Ruiva	11,67 b	9,32 c	R
BRS Rio Verde	11,42 b	8,79 c	R
C.V. (%) =	18,64	28,05	-

626 Abreviaturas: CCRMBC, Coleção de Culturas Rosa Mariano de *Burkholderia cenocepacia*.

627 ¹Período de incubação da doença baseado em horas. ²Média de quatro repetições. ³Severidade da doença baseada
 628 nas medições em milímetros do diâmetro da lesão em dois sentidos opostos. ⁴Classe de resistência: R (resistente),
 629 MR (Moderadamente resistente), S (Suscetível). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não
 630 diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).
 631

632

633 **Tabela 6.** Sensibilidade de isolados de *Burkholderia cenocepacia* e *B. orbicola* causadoras da podridão das
 634 escamas em cebola a diferentes concentrações de sulfato de cobre.

Isolado	Espécie	Cidade/Estado	Crescimento em Sulfato de Cobre (mg.L ⁻¹)				
			0	100	200	300	400
CCRMBC 27	<i>B. orbicola</i>	Orocó, PE	+	+	+	-	-
CCRMBC 55	<i>B. cenocepacia</i>	Belém de São Francisco, PE	+	+	+	-	-
CCRMBC 60	<i>B. orbicola</i>	Petrolândia, PE	+	+	+	-	-
CCRMBC 61	<i>B. cenocepacia</i>	Belém de São Francisco, PE	+	+	+	-	-
CCRMBC 67	<i>B. orbicola</i>	Petrolândia, PE	+	+	+	-	-
CCRMBC 157	<i>B. cenocepacia</i>	Belém de São Francisco, PE	+	+	+	-	-

635 Abreviaturas: CCRMBC, Coleção de Culturas Rosa Mariano de *Burkholderia cenocepacia*.

636 Símbolos: +, positivo; -, negativo.
 637

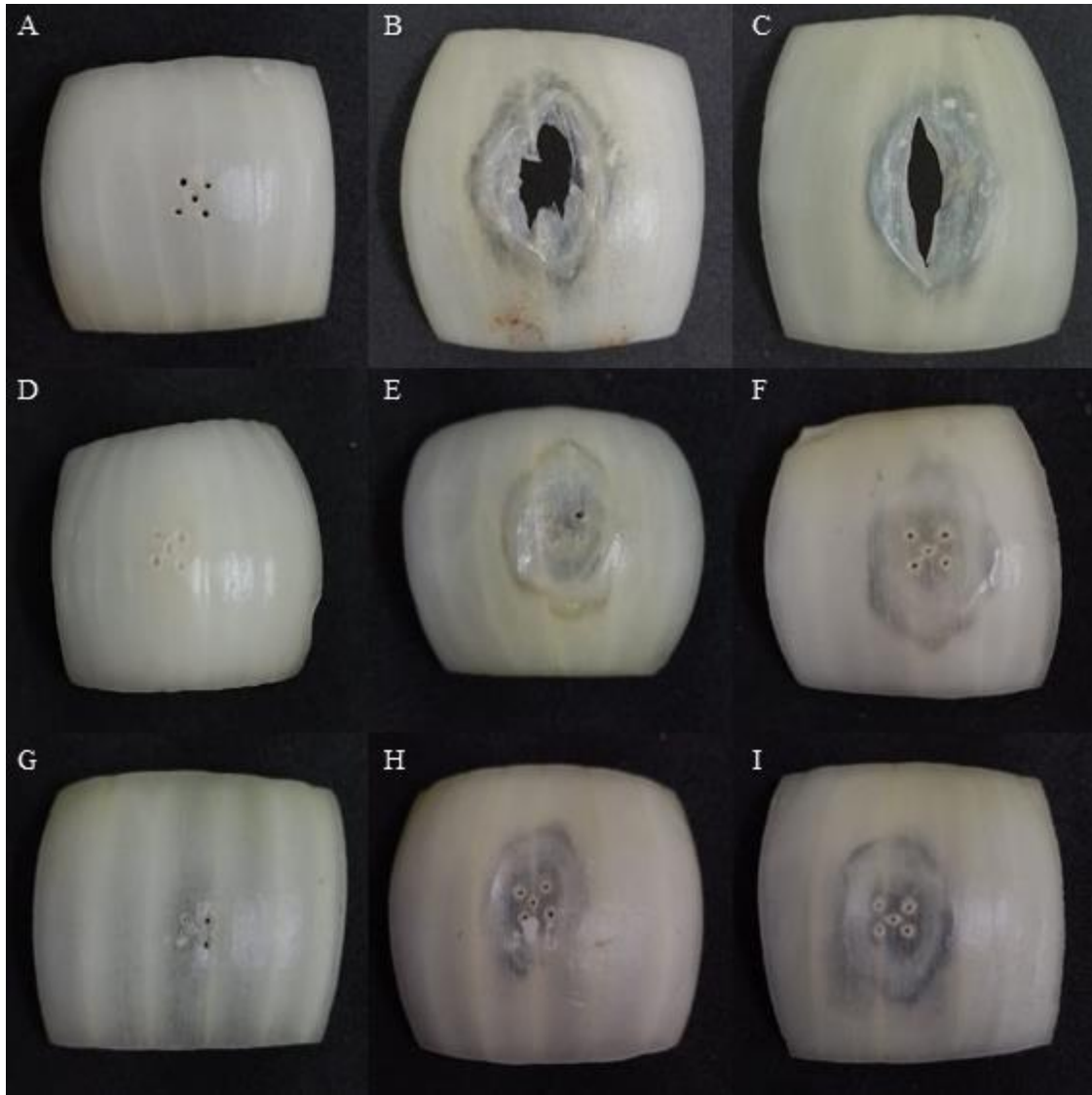


Figura 1. Reação de genótipos de cebola suscetível e resistentes a *Burkholderia cenocepacia* e *B. orbicola*. No sentido da direita tem-se catáfilos de cebola inoculados artificialmente com ADE e os isolados CCRMBC 157 de *B. cenocepacia* e CCRMBC 60 de *B. orbicola*, respectivamente. (A-C) Genótipo suscetível Régia; (D-F) Genótipo resistente Beta Cristal; (G-I) Genótipo resistente Alvorada.

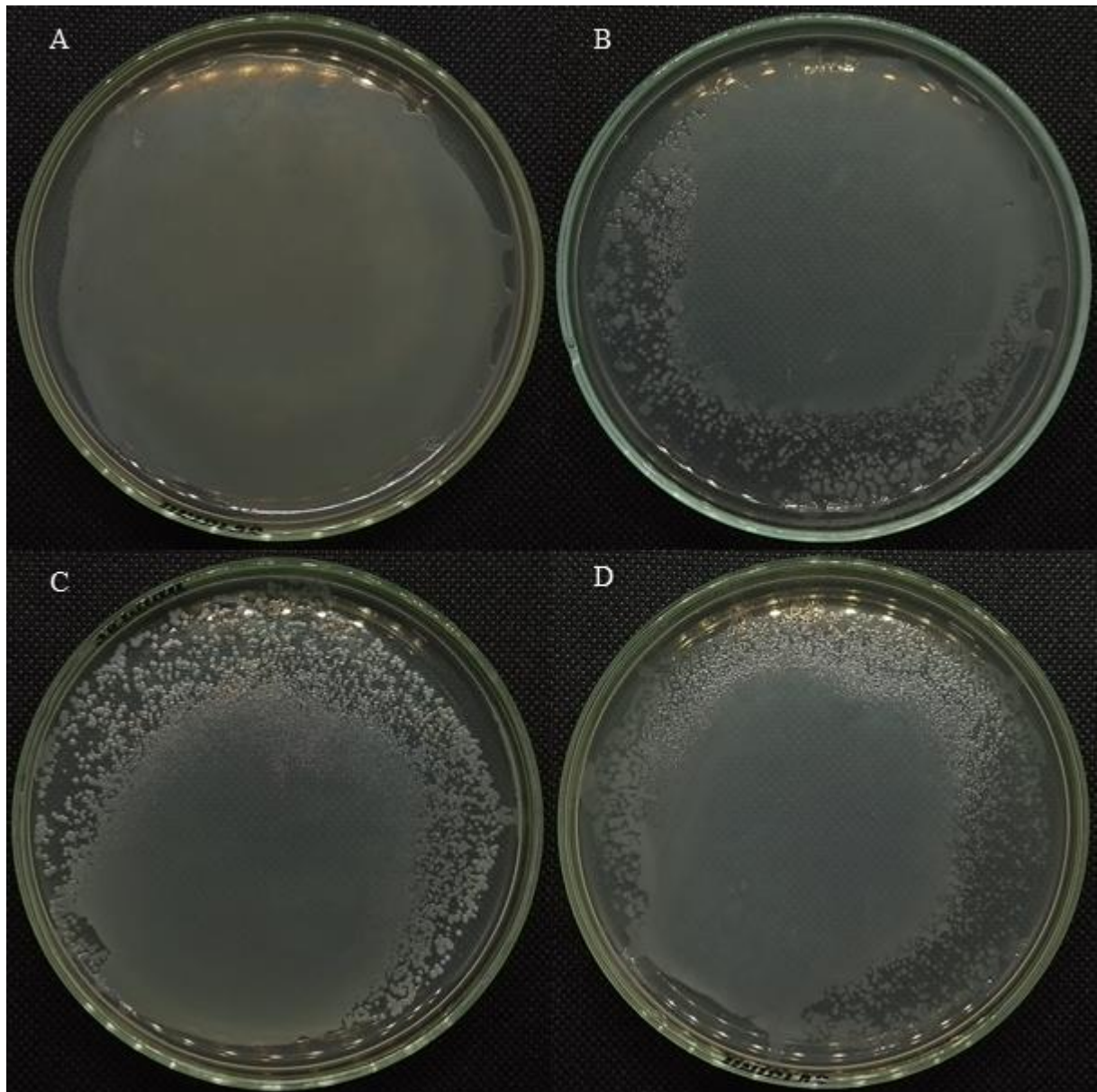


Figura 2. Sensibilidade de isolados de *Burkholderia cenocepacia* e *B. orbicola* ao sulfato de cobre. No sentido da direita tem-se sulfato de cobre nas concentrações de 300 e 400 mg.L-1 de Cu^{2+} , respectivamente. (A-B) *Burkholderia cenocepacia*; (C-D) *Burkholderia orbicola*.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- Os 44 genótipos de cebola avaliados apresentaram níveis de resistência variáveis à podridão bacteriana das escamas, sendo selecionados 28 genótipos com padrão de resistência a *Burkholderia cenocepacia* e 23 genótipos a *B. orbicola*.
- O padrão de resistência apresentado permaneceu estável para 15 genótipos quanto a *B. cenocepacia*, sendo este comportamento observado apenas em 9 genótipos quanto a *B. orbicola*. Os genótipos Baia Periforme Agro-ceres, Beta Cristal, BRS Rio Verde, Crioula Mercosul, IPA 7, Primeiro e Rainha mantiveram-se estáveis a ambas as espécies bacterianas, os caracterizando como fontes promissoras de resistência a podridão bacteriana das escamas.
- O sulfato de cobre apresentou atividade bacteriostática sobre ambas as espécies bacterianas em concentrações a partir de 300 mg.L⁻¹ de Cu²⁺, podendo ser explorado o seu uso potencial para o manejo preventivo da podridão bacteriana das escamas no Nordeste do Brasil.