

JOÃO CÉSAR DA SILVA

**NICHOS DE SOBREVIVÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DE *Xanthomonas*
campestris PV. *campestris*, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO NEGRA DAS
BRÁSSICAS**

Botucatu

2020

JOÃO CÉSAR DA SILVA

NICHOS DE SOBREVIVÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* PV. *campestris*, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO NEGRA DAS BRÁSSICAS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

Coorientador: Prof. Dr. Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior

Botucatu

2020

S586n Silva, João César da
Nichos de sobrevivência e disseminação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das brássicas / João César da Silva. -- Botucatu, 2020
89 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu
Orientador: Antonio Carlos Maringoni
Coorientador: Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior

1. Bacteria. 2. Ervas daninhas. 3. Plantas cultivadas. 4. Solos. 5. Insetos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: NICHOS DE SOBREVIVÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* PV. *campestris*, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO NEGRA DAS BRÁSSICAS

AUTOR: JOÃO CÉSAR DA SILVA

ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS MARINGONI

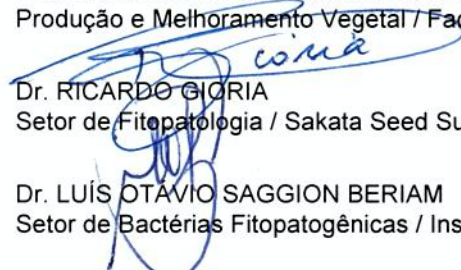
COORDENADOR: TADEU ANTÔNIO FERNANDES DA SILVA JÚNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP


Prof.^a Dr.^a RENATE KRAUSE SAKATE
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP


Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP


Dr. RICARDO GIORIA
Setor de Fitopatologia / Sakata Seed Sudamerica Ltda.

Dr. LUÍS OTÁVIO SAGGION BERIAM
Setor de Bactérias Fitopatogênicas / Instituto Biológico de Campinas

Botucatu, 12 de março de 2020

*Aos meus amados pais,
Juarez e Ivonete, e a meu irmão André,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus que ilumina meus caminhos.

Aos meus pais Juarez Francolino da Silva e Ivonete Lourencetti da Silva, pelo amor incondicional, imenso apoio, paciência e compreensão durante meus estudos.

Ao meu irmão André Luiz da Silva, pelo apoio e incentivo.

Ao meu padrinho Rafael Octávio Garcia pela amizade, apoio e conselhos.

Aos meus avós (*in memorian*) Agenor Lourencetti e Alzira Mantovani Lourencetti, Elisiário Francolino da Silva e Mariana Rosa da Silva, pelas lições deixadas em vida e por terem me amado até o último minuto de suas vidas.

A todos meus familiares, pelo reconhecimento, amizade e suporte oferecido sempre que necessário.

Ao professor e orientador Antonio Carlos Maringoni pela oportunidade, confiança, paciência, incentivo e ensinamentos.

Ao coorientador Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior, pela amizade, ensinamentos, incentivo e pela grande contribuição na realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Proteção Vegetal, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

À professora de Inglês Fabiana Sansone pela amizade, ensinamentos, apoio e conselhos.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, José Marcelo Soman, Daniele Maria do Nascimento, Luana Laurindo de Melo e Letícia Rodrigues Oliveira, pelo apoio, amizade, ensinamentos, momentos compartilhados e pela ajuda imprescindível na realização dos trabalhos.

Aos estagiários, Bianca Gêa, Renan Eburneo, Karine Giroto, Thiago Tomasini e Vilson Eburneo, pela amizade e pela ajuda imprescindível.

A todos os amigos do Departamento de Proteção Vegetal, Ana Laura, Angélica Nogueira, Bruna Catóia, Bruno de Marchi, Eduardo Vicentim, Eduardo Gorayeb, Felipe Barreto, Giovana Cruciol, Juliana Uzan, Leonardo Dovigo, Luís Watanabe, Marcos Roberto, Paula Leite, Rafaela Ruschel e Vinicius Bello, obrigado pela amizade, apoio e companhia.

Aos amigos de academia Diego Alves e Amanda Minghini, Jefferson Carreira e Rafaela Eufrazio, pela amizade, apoio e companhia.

Aos amigos de longa data Aline Zonatto, Alisson Fernando, David Spadotti, Diego Frutuoso, Júlio Marubayashi, Lilian Utraga, Martha Passador, Tatiane Ferrari e Viviane Miranda, pela amizade e companhia em todos os momentos.

A todos os agricultores, por abrir as portas de suas propriedades para que pudéssemos realizar os experimentos.

Aos funcionários da Sakata, Dr. Aniello Cutolo Filho, Dr. Ricardo Gioria, Reginaldo Antonio Valerio e Wellington Barroso dos Santos, pela disponibilidade, atenção e por todo suporte oferecido para a realização dos trabalhos.

Aos funcionários do Departamento de Proteção Vegetal, pela amizade e apoio prestado.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), por todo o apoio institucional e disponibilidade da estrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado no período de março de 2016 a outubro de 2017.

Este trabalho foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido por meio de bolsa de doutorado no período de novembro de 2017 a fevereiro de 2020 (Processo FAPESP nº: 2017/13822-0).

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

A podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), é considerada a doença bacteriana mais importante das brássicas no mundo. Apesar dos esforços para o manejo, sua ocorrência é comum em cultivos de brássicas. O conhecimento dos nichos de sobrevivência e mecanismos de disseminação de Xcc são de extrema importância para o manejo eficiente da podridão negra. Este trabalho avaliou a sobrevivência de Xcc em nichos ecológicos, assim como o potencial de disseminação da bactéria por insetos. Para identificar as plantas daninhas que podem favorecer a sobrevivência epifítica de Xcc, assim como novas hospedeiras sintomáticas da bactéria, coletas foram realizadas em seis campos de cultivo de brássicas do estado de São Paulo, em 2017 e 2018. A capacidade endofítica do isolado 3098C de Xcc, resistente a rifampicina, foi avaliada em quatro experimentos em casa de vegetação, entre 2017 e 2019, utilizando-se 23 espécies de plantas daninhas e dois métodos de inoculação. Em campo, quatro experimentos foram instalados entre 2017 e 2019 para avaliar a sobrevivência de Xcc na filosfera e rizosfera de 20 espécies de plantas cultivadas. A sobrevivência do isolado 3098C na rizosfera do repolho cultivado em seis tipos de solos também foi avaliada, em quatro experimentos. Além da sobrevivência, a disseminação de Xcc por *Bemisia tabaci* e *Myzus persicae* foi avaliada em experimentos em condições controladas. Como resultados, 30 espécies de plantas daninhas de 14 famílias botânicas foram coletadas dos seis campos de cultivo de brássicas, sendo Xcc recuperada da filosfera de 25 espécies. Em plantas sintomáticas, a bactéria foi isolada de *Bidens pilosa* (picão preto), *Coronopus didymus* (mentruz rasteiro), *Galinsoga parviflora* (picão branco), *Ipomoea nil* (corda de viola), *Lepidium virginicum* (mentruz), *Raphanus raphanistrum* (nabiça), *Raphanus sativus* (nabo forrageiro) e *Sonchus oleraceus* (serralha). Nos experimentos em casa de vegetação, Xcc foi recuperada de todas as plantas daninhas, porém os períodos de sobrevivência endofítica variaram entre as espécies. A presença de ferimentos pode ter favorecido a sobrevivência endofítica de Xcc nos tecidos de algumas espécies. Na filosfera das plantas cultivadas, a bactéria sobreviveu por até 70 dias no repolho, tomate, trigo, aveia preta, nabo forrageiro e pimentão, por até 63 dias em abóbora e mostarda, e por até 56 dias no feijão. Na rizosfera das plantas cultivadas, Xcc apresentou baixa sobrevivência em comparação ao solo na ausência de plantas para a maioria das espécies avaliadas, sendo o maior

período de sobrevivência observado na rizosfera do repolho (70 dias). Baixa sobrevivência da bactéria ocorreu na rizosfera do repolho quando cultivado em diferentes solos. *Bemisia tabaci* e *M. persicae* aparentemente não estão envolvidos na disseminação de Xcc.

Palavras-chave: Bactéria. Plantas daninhas. Plantas cultivadas. Solo. Insetos.

ABSTRACT

Black rot, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), is considered the most important bacterial disease of brassica worldwide. Despite management efforts, its occurrence is common in brassica crops. Knowledge of survival niches and Xcc dissemination mechanisms are extremely important for the efficient management of black rot. This study evaluated Xcc survival in ecological niches, as well as the potential for the bacterium dissemination by insects. To identify the weeds that may favor Xcc epiphytic survival, as well as new symptomatic hosts of the bacterium, collections were carried out in six brassica crop fields in São Paulo State, in 2017 and 2018. The endophytic capacity of Xcc 3098C strain, resistant to rifampicin, was evaluated in four greenhouse experiments between 2017 and 2019, using 23 weed species and two inoculation methods. In the field, four experiments were conducted between 2017 and 2019 to assess Xcc survival in the phyllosphere and rhizosphere of 20 crop species. The survival of 3098C strain in cabbage rhizosphere, grown in six soils types, was also evaluated in four experiments. In addition to survival, Xcc dissemination by *Bemisia tabaci* and *Myzus persicae* was evaluated in experiments under controlled conditions. As a result, 30 weed species from 14 botanical families were collected from the six brassica crop fields, and Xcc was recovered from the phyllosphere of 25 species. In symptomatic plants, the bacterium was isolated from *Bidens pilosa* (hairy beggarticks), *Coronopus didymus* (swinecress), *Galinsoga parviflora* (gallant soldier), *Ipomoea nil* (whiteedge morning-glory), *Lepidium virginicum* (virginia pepperweed), *Raphanus raphanistrum* (wild radish), *Raphanus sativus* (cultivated radish) and *Sonchus oleraceus* (common sowthistle). In greenhouse experiments, Xcc was recovered from all weeds, but the periods of endophytic survival varied among species. The presence of wounds may have favored Xcc endophytic survival in some species tissues. In crops phyllosphere, the bacterium survived for up to 70 days in cabbage, tomato, wheat, black oat, turnip and pepper, for up to 63 days in pumpkin and mustard, and for up to 56 days in beans. In crops rhizosphere, Xcc showed low survival compared with the soil without plants for most of the species evaluated, being the longest survival period observed in cabbage rhizosphere (70 days). Low bacterial survival occurred in cabbage rhizosphere when grown in different soils. *Bemisia tabaci* and *M. persicae* are apparently not involved in Xcc dissemination.

Keywords: Bacterium. Weeds. Cultivated plants. Soil. Insects.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
	CAPÍTULO 1 - PLANTAS DANINHAS COMO NICHOS DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>Xanthomonas campestris</i> PV. <i>campestris</i>.....	21
1.1	INTRODUÇÃO.....	23
1.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.2.1	Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em plantas daninhas coletadas em campos de cultivo de brássicas.....	24
1.2.1.1	Processamento das amostras, isolamento e preservação de colônias bacterianas.....	25
1.2.2	Sobrevivência endofítica de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em plantas daninhas mantidas em casa de vegetação.....	27
1.2.2.1	Obtenção e cultivo das plantas daninhas.....	27
1.2.2.2	Instalação dos experimentos.....	28
1.2.2.3	Processamento das amostras, isolamento e preservação de colônias bacterianas.....	29
1.2.4	Delineamento experimental e análise dos dados.....	29
1.2.5	Caracterização de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	29
1.3	RESULTADOS.....	31
1.3.1	Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em plantas daninhas coletadas em campos de cultivo de brássicas.....	31
1.3.2	Sobrevivência endofítica de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em plantas daninhas em casa de vegetação.....	33
1.3.3	Caracterização dos isolados bacterianos.....	35
1.4	DISCUSSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	41
	CAPÍTULO 2 - OCORRÊNCIA DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> EM NABIÇA (<i>Raphanus raphanistrum</i> L.) NO BRASIL....	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	CAPÍTULO 3 - SOBREVIVÊNCIA DE <i>Xanthomonas campestris</i> PV. <i>campestris</i> NA FILOSFERA E RIZOSFERA DE PLANTAS CULTIVADAS.....	46
3.1	INTRODUÇÃO.....	48
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.2.1	Locais de condução dos experimentos e isolado bacteriano.....	49
3.2.2	Sobrevivência de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas.....	50
3.2.2.1	Obtenção e cultivo das espécies cultivadas.....	50
3.2.2.2	Instalação dos experimentos.....	51
3.2.2.3	Processamento das amostras.....	51
3.2.2.4	Dados climáticos.....	51
3.2.3	Sobrevivência de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> na rizosfera do repolho cultivado em seis tipos de solos.....	52
3.2.3.1	Coleta e características dos solos.....	52
3.2.3.2	Instalação dos experimentos e processamento.....	53
3.2.4	Delineamento experimental e análises dos dados.....	53

3.2.5	Caracterização de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> PCR.....	54
3.3	RESULTADOS.....	55
3.3.1	Sobrevivência de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas.....	55
3.3.2	Sobrevivência de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> na rizosfera do repolho cultivado em seis tipos de solos.....	61
3.3.3	Caracterização dos isolados bacterianos.....	62
3.4	DISCUSSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	67
	CAPÍTULO 4 - DISSEMINAÇÃO DE <i>Xanthomonas campestris</i> PV. <i>campestris</i> POR INSETOS.....	71
4.1	INTRODUÇÃO.....	73
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.2.1	Local de realização dos experimentos.....	74
4.2.2	Isolado bacteriano e condições de cultivo e preservação.....	74
4.2.3	Obtenção e manutenção das populações dos insetos.....	74
4.2.4	Confirmação da ausência de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> nos insetos.....	75
4.2.5	Obtenção das plantas de couve.....	75
4.2.6	Aderência de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em <i>Bemisia tabaci</i> e <i>Myzus persicae</i>	75
4.2.6.1	Exposição dos insetos a discos de couve inoculados com <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	75
4.2.6.2	Exposição dos insetos a plantas de couve inoculadas com <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	76
4.2.7	Disseminação de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> por <i>Bemisia tabaci</i> e <i>Myzus persicae</i>	76
4.2.8	Determinação da população de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> na filosfera.....	77
4.2.9	Processamento de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> de <i>Bemisia tabaci</i> e <i>Myzus persicae</i>	77
4.3	RESULTADOS.....	78
4.3.1	População de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> na filosfera.....	78
4.3.2	Aderência de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> nos insetos.....	79
4.3.3	Disseminação de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> por <i>Bemisia tabaci</i> e <i>Myzus persicae</i> em plantas couve.....	79
4.4	DISCUSSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	83
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
	REFERÊNCIAS.....	87

INTRODUÇÃO GERAL

A família Brassicaceae é composta por aproximadamente 3.709 espécies e mais de 338 gêneros distribuídos pelo mundo, incluindo plantas de grande importância econômica usadas na alimentação como vegetais, óleos e condimentos, na indústria para produção de biodiesel e bioprodutos, assim como forragens e ornamentais (WARWICK, 2011; ANJUM et al., 2012). Dentre as espécies utilizadas para a alimentação humana, destaca-se o cultivo de *Brassica oleracea* L., que compreende as variedades: repolho, brócolis, couve-flor, couve-de-folha, couve-tronchuda e couve-de-bruxelas (FILGUEIRA, 2008; MICHEREFF et al., 2012). A produção mundial de brássicas em 2017 foi de aproximadamente 97,4 milhões de toneladas, sendo China e Índia os maiores produtores mundiais (FAOSTAT, 2019). O Brasil nesse mesmo período produziu 82,6 mil toneladas (HORTIFRUTI, 2019).

Dentre as doenças que ocorrem em cultivos de brássicas e causam grandes danos, destaca-se a podridão negra, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Downson 1939 (Xcc) (WILLIAMS, 1980; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). Essa doença foi descrita pela primeira vez por Garman, 1890, em repolho no Kentucky, EUA, porém a natureza patogênica do agente causal foi comprovada cinco anos mais tarde por Pammel (ALVAREZ, 2000; VICENTE; HOLUB, 2013). Atualmente, a podridão negra encontra-se presente em todos os países onde há cultivo de brássicas, sendo considerada um problema em regiões tropicais, subtropicais e continentais úmidas. Em regiões frias também ocorre, porém raramente evolui a ponto de causar danos às plantas (WILLIAMS, 2007; LEMA et al., 2012).

No campo os sintomas da podridão negra são observados em qualquer estágio fenológico de desenvolvimento das plantas, e se caracterizam por lesões amarelas nas margens das folhas em formato de “V” e o escurecimento do sistema vascular, comumente relacionado à penetração de Xcc pelos hidatódios (WILLIAMS, 1980; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). Com o desenvolvimento da doença os tecidos lesionados necrosam e as folhas podem cair prematuramente (VICENTE; HOLUB, 2013). Lesões alongadas, necróticas e com halos amarelecidos são muitas vezes observadas no limbo foliar e estão relacionadas a penetração da bactéria pelos estômatos (MARINGONI et al., 2016). Infecções secundárias causadas por outras espécies bacterianas podem contribuir para o apodrecimento das plantas

afetadas (WILLIAMS, 1980; VICENTE; HOLUB, 2013). O controle da podridão negra é realizado através do uso de material propagativo sadio, eliminação de restos culturais, rotação de culturas com espécies não hospedeiras do patógeno e cultivares com níveis de resistência (GRIESBACH; LÖPTIEN; MIERSCH, 2003; LEMA et al., 2012; VICENTE; HOLUB, 2013).

Apesar dos esforços para controlar a doença, sua ocorrência é frequente em campos de produção de brássicas, causando perdas expressivas na produção (WILLIAMS, 2007; SINGH; DHAR; YADAVA, 2011). O conhecimento dos nichos de sobrevivência e mecanismos de disseminação dos fitopatógenos são de extrema importância para o manejo de doenças (BROWN, 1997). Bactérias fitopatogênicas são capazes de sobreviver associadas a sementes ou estruturas vegetativas, no solo e em restos culturais (LEBEN, 1974; SCHUSTER; COYNE, 1974; GOTO, 1992). Em plantas cultivadas e daninhas, as bactérias podem colonizar os tecidos internos e causar danos com a presença de sintomas, assim como não causar nenhuma manifestação visível de doença, fenômeno conhecido como sobrevivência endofítica; as bactérias também podem sobreviver como epífitas, quando multiplicam na superfície das plantas sem infectá-las (BEATTIE; LINDOW, 1995; ROMEIRO, 2005; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). A disseminação das fitobactérias da fonte de inóculo para plantas saudáveis no campo ocorre através de agentes bióticos (homem, insetos, animais etc.) e abióticos (chuva, vento, enxurrada etc.), a curtas e longas distâncias (AGRIOS, 2005; ROMEIRO, 2005).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* pode sobreviver por até três anos em sementes de brássicas (GRIESBACH; LÖPTIEN; MIERSCH, 2003). No solo, experimentos realizados em condições de campo na Geórgia, EUA, comprovaram que a bactéria sobreviveu por 42 dias no inverno, porém, quando associada a restos vegetais de brássicas foi capaz de sobreviver 244 dias (SCHAAD; WHITE, 1974). Xcc pôde ser recuperada do solo 14 semanas após a colheita do repolho no Havaí (ALVAREZ; CHO, 1978). A bactéria também foi detectada em caules de couve-de-bruxelas sob condições de campo, após 24 meses, na Holanda (KÖHL et al., 2011). Em experimentos conduzidos no Brasil, Xcc sobreviveu por apenas 7 dias como células livres no solo, porém em restos culturais de couve-flor sobreviveu por até 255 dias (SILVA JÚNIOR et al., 2020). Na rizosfera, área no solo entorno das raízes (VORHOLT, 2012), a bactéria foi capaz de sobreviver por até 28 dias em *Raphanus raphanistrum* (SILVA et al., 2017). A rizosfera de plantas hospedeiras, assim como

plantas cultivadas utilizadas em rotação com brássicas poderiam fornecer condições para a sobrevivência de Xcc por um longo período, porém até o momento, nenhum estudo foi realizado abordando o assunto.

As plantas daninhas são importantes reservatório de Xcc. Em levantamentos realizados em áreas agrícolas na Califórnia e Geórgia, EUA, Xcc foi isolada de plantas sintomáticas de *Brassica campestris* (mostarda), *Brassica geniculata* (mostarda-bastarda), *Brassica nigra* (mostarda-preta) e *Raphanus sativus* (nabo). A bactéria também foi isolada de plantas assintomáticas de *Lepidium virginicum* (mentruz), *Coronopus didymus* (mentruz-rasteiro) e *Cardaria pubescens* (SCHAAD; DIANESE, 1981). A filosfera, que compreende às superfícies das plantas acima do solo dominadas pelas folhas (VORHOLT, 2012; STONE; WEINGARTEN; JACKSON, 2018), é um importante nicho para a sobrevivência de Xcc. Na Geórgia, a bactéria foi detectada na filosfera de *Lepidium virginicum* (SCHAAD; DIANESE, 1981). Em um estudo recente, Xcc foi capaz de sobreviver por 56 e 70 dias na filosfera de *Lepidium virginicum* e *Raphanus raphanistrum*, respectivamente (SILVA et al., 2017). Culturas utilizadas em sucessão e rotação com brássicas também poderiam fornecer condições para sobrevivência de Xcc. Nos EUA, a bactéria foi recuperada da filosfera de plantas de alface 48 dias após a inoculação, no arroz, entretanto, a bactéria sobreviveu por apenas 9 dias (ARIAS; NELSON; ALVAREZ, 2000).

Com relação à disseminação de Xcc, à longas distâncias e em áreas ainda isentas da podridão negra, ocorre principalmente via sementes infectadas (MASSOMO et al., 2003). Respingos de chuva ou água de irrigação são responsáveis disseminar a bactéria em uma mesma planta, ou então, para plantas vizinhas no campo (KOCKS; ZADOKS; RUISSEN, 1999). Insetos desempenham importante papel na disseminação de bactérias (ZANDJANAKOU-TACHIN et al., 2007), porém para Xcc esse fato é pouco conhecido e estudado (VAN DER WOLF; VAN DER ZOUWEN, 2010). Um dos primeiros estudos foi realizado com o coleóptero *Phyllotreta cruciferae* (Coleoptera: Chrysomelidae), praga importante da cultura do repolho nos EUA, que apresentou limitado potencial para a disseminação de Xcc em experimentos realizados sob condições controladas (SHELTON; HUNTER, 1985). Resultados satisfatórios foram obtidos empregando-se a mosca polinizadora *Calliphora vomitoria* (Diptera: Calliphoridae). Moscas contaminadas com Xcc e mantidas em gaiolas contendo plantas saudáveis de couve-flor no período da floração resultaram em lotes de sementes com elevada incidência de Xcc (VAN DER WOLF;

VAN DER ZOUWEN, 2010). Para as condições brasileiras, até o momento, não foram realizados estudos abordando o assunto.

O conhecimento dos nichos de sobrevivência e a capacidade de disseminação de Xcc por insetos permitirá um manejo mais efetivo da podridão negra no Brasil. Práticas como a eliminação de plantas daninhas hospedeiras, incorporação de restos culturais, rotação de culturas com plantas que não favoreçam a sobrevivência da bactéria e o controle de insetos poderão contribuir para a redução do inóculo nos campos de cultivo e, conseqüentemente, reduzir a ocorrência frequente da podridão negra.

Este trabalho teve como objetivos: (I) identificar as plantas daninhas que podem favorecer a sobrevivência epifítica de Xcc em campos de cultivo de brássicas, assim como espécies hospedeiras da bactéria (II) avaliar o potencial de sobrevivência endofítica de Xcc em plantas daninhas mantidas em casa de vegetação; (III) avaliar a capacidade de sobrevivência de Xcc na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas; (IV) avaliar a capacidade de sobrevivência de Xcc na rizosfera de plantas de repolho cultivadas em diferentes tipos de solo; (V) avaliar o potencial de disseminação de Xcc por *Bemisia tabaci* e *Myzus persicae* em condições controladas.

CAPÍTULO 1 - PLANTAS DANINHAS COMO NICHOS DE SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* PV. *campestris*

João César da Silva, Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior, José Marcelo Soman, Daniele Maria do Nascimento, Luana Laurindo de Melo, Letícia Rodrigues Oliveira, Maria Márcia Pereira Sartori, Antonio Carlos Maringoni

RESUMO

As plantas daninhas desempenham importante papel nos ecossistemas agrícolas, hospedando patógenos como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), agente causal da podridão negra das brássicas. Poucas são as informações disponíveis a respeito das plantas daninhas que favorecem a sobrevivência de Xcc nas condições brasileiras, o que motivou este estudo. Plantas daninhas assintomáticas e sintomáticas foram coletadas durante os anos de 2017 e 2018, em seis campos de cultivo de brássica no estado de São Paulo, para identificar as espécies que podem favorecer a sobrevivência epifítica de Xcc, assim como plantas daninhas hospedeiras. A sobrevivência endofítica do isolado 3098C de Xcc também foi avaliada em quatro experimentos, em casa de vegetação, com 23 espécies de plantas daninhas de 14 famílias botânicas, envolvendo dois métodos de inoculação: pulverização da suspensão bacteriana e ferimentos com agulhas múltiplas seguido por pulverização. Foram coletadas 30 espécies de plantas daninhas nos campos de cultivo e Xcc recuperada da filosfera de 25 espécies. Plantas de *Bidens pilosa* (picão preto), *Coronopus didymus* (mentruz rasteiro), *Galinsoga parviflora* (picão branco), *Ipomoea nil* (corda de viola), *Lepidium virginicum* (mentruz), *Raphanus raphanistrum* (nabiça), *Raphanus sativus* (nabo forrageiro) e *Sonchus oleraceus* (serralha) foram identificadas como hospedeiras sintomáticas de Xcc. Em casa de vegetação, Xcc foi recuperada de todas as espécies de plantas daninhas avaliadas, porém os períodos de sobrevivência variaram entre elas. A presença de ferimentos favoreceu a sobrevivência endofítica de Xcc em algumas espécies. Com base nos resultados, recomenda-se o controle de plantas daninhas hospedeiras e favoráveis a sobrevivência de Xcc em áreas com cultivo de brássicas e histórico de podridão negra.

Palavras-chave: Podridão negra. Bactéria. Hospedeiros alternativos.

ABSTRACT

Weeds play an important role in agricultural ecosystems, hosting pathogens such as *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), causal agent of brassica's black rot. Little information is available regarding the weeds that favor Xcc survival in Brazilian conditions, which motivated this study. Asymptomatic and symptomatic weeds were collected in 2017 and 2018, in six brassica crop fields in São Paulo State, to identify the species that may favor Xcc epiphytic survival, as well as host weeds. The endophytic survival of Xcc 3098C strain was also evaluated in four experiments, in a greenhouse, with 23 weed species from 14 botanical families, involving two methods of inoculation: spraying of the bacterial suspension and wounds with multiple needles followed by spraying. Thirty species of weeds were collected in crop fields and Xcc was recovered from the phyllosphere of 25 species. Plants of *Bidens pilosa* (hairy beggarticks), *Coronopus didymus* (swinecress), *Galinsoga parviflora* (gallant soldier), *Ipomoea nil* (whiteedge morning-glory), *Lepidium virginicum* (virginia pperweed), *Raphanus raphanistrum* (wild radish), *Raphanus sativus* (cultivated radish) and *Sonchus oleraceus* (common sowthistle) were identified as Xcc symptomatic hosts. Xcc was recovered from all the weed species evaluated in greenhouse, but the survival periods varied among them. The presence of wounds favored Xcc endophytic survival in some species. Based on the results, it is recommended to control the weeds hosts which are favorable to Xcc survival in areas with brassica cultivation and a history of black rot.

Keywords: Black rot. Bacterium. Alternative hosts.

1.1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas emergem espontaneamente nos ecossistemas agrícolas e limitam a produção das culturas principalmente pela competição direta por recursos como água, luz e nutrientes (LORENZI, 2008; LIU et al., 2009). As plantas daninhas também são hospedeiras de agentes fitopatogênicos como bactérias, fungos e vírus e atuam como reservatório de inóculo, podendo desempenhar importante papel na epidemiologia das doenças (AGRIOS, 2005; ROMEIRO, 2005; KARIMI; ARZANLOU; PERTOT, 2019).

Bactérias fitopatogênicas são responsáveis por causar doenças em uma ampla gama de plantas de valor econômico e ocasionar perdas expressivas na produção (GOTO, 1992; BULL et al., 2016). Embora práticas de manejo como a rotação de culturas, eliminação de restos culturais, “roguing” e o tratamento de sementes contribuam para descontinuidade do inóculo no campo, a presença de plantas daninhas hospedeiras permite a sobrevivência das fitobactérias entre as estações de cultivo (SCHUSTER; COYNE, 1974; AGRIOS, 2005). Populações bacterianas podem colonizar os tecidos internos das plantas daninhas e causar doença, assim como não causar danos aparentes, fenômeno conhecido como sobrevivência endofítica. Externamente, as bactérias podem ser encontradas na filosfera e rizosfera das plantas daninhas (GOTO, 1992; BEATTIE; LINDOW, 1995; ROMEIRO, 2005; KADO, 2010).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc), agente causal da podridão negra das brássicas, é patogênica a várias espécies de plantas daninhas. *Brassica campestris*, *Brassica geniculata*, *Brassica nigra* e *Raphanus sativus* foram encontradas naturalmente infectadas por Xcc em campos na Califórnia e Geórgia, EUA, apresentando lesões amarelas em formato “V” nas margens das folhas, semelhantes aos sintomas causados pela podridão negra (SCHAAD; DIANESE, 1981). Além dessas espécies, Xcc foi detectada em *Brassica napus*, *Brassica tournefortii* e *Sisymbrium officinale* na Califórnia, EUA (IGNATOV et al., 2007). Plantas sintomáticas de *Capsella bursa-pastoris* também foram identificadas como hospedeira da bactéria nos EUA (ZHAO; DAMICONE; BENDER, 2002) e na Nova Zelândia (LEYNS et al., 1984).

As plantas daninhas podem atuar como reservatório de Xcc e desempenhar importante papel na epidemiologia da podridão negra, mesmo não demonstrando sintomas de infecção (SCHAAD; DIANESE, 1981; DANE; SHAW, 1996). Na Alemanha, Xcc foi isolada de plantas sadias de *Thlaspi arvense*, *Stellaria media*,

Chenopodium album, *Sonchus oleraceus*, *Polygonum lapathifolium* e *Urtica urens* (KRAUTHAUSEN et al., 2018). Nos EUA, a bactéria foi detectada em plantas assintomáticas de *Lepidium virginicum*, *Coronopus didymus* e *Cardaria pubescens*. Populações epífitas de Xcc também foram detectadas em folhas de *Lepidium virginicum* (SCHAAD; DIANESE, 1981). Na Índia, Xcc foi recuperada da filosfera de *Centella asiatica* (KISHUN; CHAND, 1988).

No Brasil poucas informações podem ser encontradas sobre as plantas daninhas hospedeiras de Xcc, assim como a importância destas plantas como reservatório de inóculo. Em um estudo recente, a sobrevivência de Xcc foi avaliada na filosfera de 26 espécies de plantas daninhas em experimentos conduzidos à campo. A bactéria foi capaz de sobreviver por até 70 dias na filosfera de *Raphanus raphanistrum* e 56 dias em *Lepidium virginicum* (SILVA et al., 2017). Entretanto, até o momento, nenhum levantamento foi realizado em campos de cultivos de brássicas com histórico de podridão negra visando detectar a presença de populações de Xcc na filosfera de plantas daninhas, assim como identificar plantas daninhas hospedeiras. Além disso, não há informações sobre a capacidade de sobrevivência endofítica da bactéria.

Este trabalho teve como objetivos: (I) identificar as plantas daninhas que podem favorecer a sobrevivência epifítica de Xcc em campos de cultivo de brássicas, assim como espécies hospedeiras da bactéria (II) avaliar o potencial de sobrevivência endofítica de Xcc em plantas daninhas mantidas em casa de vegetação.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em plantas daninhas coletadas em campos de cultivo de brássicas

Durante os anos de 2017 e 2018 foram realizadas 39 coletas de plantas daninhas assintomáticas e sintomáticas em seis campos de cultivo de brássicas e com histórico de podridão negra, localizados nos municípios de Pardinho (23°2'32" S / 48°22'48" W), Botucatu (22°58'4" S / 48°27'27" W), São Manuel (22°46'16" S / 48°34'08" W) (Região 1); Ibiúna (Campo 1, 23°37'12" S / 47°13'08" W e Campo 2, 23°39'12" S / 47°16'20" W) e Piedade (23°46'37" S / 47°31'22" W) (Região 2) no estado de São Paulo.

As áreas escolhidas para as amostragens das plantas daninhas eram cultivadas com variedades da espécie *Brassica oleracea*, apresentavam incidência variável da doença e níveis variados de infestação de plantas daninhas. As coletas foram

realizadas nessas áreas durante 2017 e 2018, mesmo quando a cultura principal era rotacionada com outra cultura ou realizado o pousio (Tabela 1).

Para a amostragem das plantas daninhas, inicialmente realizava-se uma análise das espécies predominantes na área. Posteriormente, coletava-se a parte aérea de dez exemplares de cada espécie, selecionadas ao acaso durante o deslocamento na lavoura seguindo padrão “W” de amostragem. As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos, transportadas para o laboratório em caixas de Isopor® contendo gelo e armazenadas em câmara fria (5 °C) até o processamento. Plantas daninhas sintomáticas também foram coletadas em carregadores, divisas das propriedades e regiões circunvizinhas.

1.2.1.1 Processamento das amostras, isolamento e preservação de colônias bacterianas

As folhas das plantas daninhas foram destacadas dos caules, acomodadas em sacos plásticos e homogeneizadas obtendo-se amostras compostas. Posteriormente, 10 g foram transferidos para frascos de Duran® contendo 200 mL de tampão fosfato-salina (PBS) 10 mM (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,9 g Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄, 1 L de água destilada esterilizada) pH 7,2 e agitadas a 300 rpm (30 min/ 25 °C). O sobrenadante das suspensões foi diluído em série (10⁰ a 10⁻⁶), 100 µL plaqueados em triplicata no meio de cultura NSCAA [20 g.L⁻¹ de nutriente ágar (Merck, Alemanha), 15 g.L⁻¹ de amido (Synth, Brasil), 250 mg.L⁻¹ cicloheximida, 10 mg.L⁻¹ de nitrofurantoína e 2,5 mg.L⁻¹ de vancomicina (SCHAAD; JONES; LACY, 2001)], e as placas incubadas (28 °C/ 72 h).

Folhas de plantas daninhas com sintomas de amarelecimento e necrose marginal foram submetidas ao isolamento conforme Maringoni (2010). Fragmentos de tecidos foram removidos da área de transição entre o tecido doente e o sadio, submetidos a desinfecção superficial em álcool 70 % (30 segundos), hipoclorito de sódio 1,5 % (60 segundos) e seguido por três lavagens em água destilada esterilizada. Posteriormente, os fragmentos foram triturados em água destilada esterilizada e as suspensões plaqueadas em meio NSCAA (incubação 28 °C/ 72 h).

Tabela 1 - Épocas e quantidades de coletas, histórico de cultivo das áreas, incidência de podridão negra e níveis de infestação de plantas daninhas em seis campos de cultivo de brássicas utilizados para coletas de plantas daninhas

Ano	Estação	Região 1			Região 2		
		Pardinho	Botucatu	São Manuel	Ibiúna C1	Ibiúna C2	Piedade
2017	Outono	3 ¹ / 2 ² Brócolis, couve, 3 ³ Alta infestação 4 ⁴ 100%	Coleta não realizada	Coleta não realizada	Coleta não realizada	Coleta não realizada	Coleta não realizada
	Inverno	1 / Couve-flor, repolho Baixa infestação 0 %	Coleta não realizada	Coleta não realizada	Coleta não realizada	Coleta não realizada	Coleta não realizada
	Primavera	2 / Brócolis, couve-flor, repolho Alta infestação 50 - 100%	1 / Brócolis Baixa infestação 100%	2 / Brócolis, couve, repolho Baixa infestação 20 - 30%	1 / Brócolis, repolho Alta infestação 55 %	1 / Acelga, brócolis, repolho Baixa infestação 20%	Coleta não realizada
2018	Verão	2 / Brócolis, repolho Alta infestação 100%	1 / Brócolis Baixa infestação 100%	1 / Couve Baixa infestação 35%	1 / Brócolis, couve-flor Alta infestação 50 - 100%	1 / Couve-flor Baixa infestação 15%	Coleta não realizada
	Outono	1 / Brócolis Baixa infestação 0%	2 / Repolho, Brócolis Alta infestação 80%	1 / Couve Baixa infestação 0 %	1 / Brócolis, couve-flor, repolho Alta infestação 100%	1/ Brócolis, repolho Baixa infestação 100%	1 / Repolho Alta infestação 100%
	Inverno	2 / Brócolis Alta infestação 100%	2 / Brócolis, repolho Baixa infestação 10 - 50%	2 / Brócolis, repolho Baixa a alta infestação 0%	1 / Brócolis Alta infestação 10%	1/ Pousio, alface Baixa infestação 0%	1 / Repolho Baixa infestação 0%
	Primavera	1 / Brócolis, repolho Alta infestação 15%	1 / Repolho, couve, couve- flor Alta infestação 90%	1 / Brócolis, repolho Alta infestação 0%	1 / Brócolis, couve-flor, feijão, repolho Alta infestação 0 - 55%	1 / Brócolis Baixa infestação 0%	1 / Repolho Alta infestação 0%

¹Número de coletas realizadas; ²Cultura presente na área; ³População de plantas daninhas nas áreas; ⁴Incidência de podridão negra em porcentagem.

Colônias puras semelhantes a *Xanthomonas* presentes na superfície do meio de cultura foram cultivadas em 700 µL de caldo nutriente (Merck, Darmstadt, Alemanha), incubadas por 24 horas, preservadas em glicerol 30 % (v/v) e mantidas a - 80 °C, para posterior caracterização.

1.2.2 Sobrevivência endofítica de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em plantas daninhas mantidas em casa de vegetação

Os experimentos foram realizados no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (UNESP), Botucatu, São Paulo. Foi utilizado nos experimentos o isolado 3098C de Xcc, que possui resistência a 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina e é patogênico a plantas de brássicas. O isolado foi previamente cultivado em nutriente sacarose ágar acrescido de rifampicina - NSAR [20 g.L⁻¹ de nutriente ágar (Merck, Alemanha), 5 g.L⁻¹ de sacarose (Synth, Brasil) e 100 µg.mL⁻¹ de rifampicina (Rifaldin)] e incubado a 28 °C por 48 h. Para o uso nos experimentos o isolado bacteriano foi preservado em glicerol 30 % (v/v) e mantido a - 80 °C.

1.2.2.1 Obtenção e cultivo das plantas daninhas

Foram utilizadas 23 espécies de plantas daninhas de 14 famílias botânicas, selecionadas segundo Silva et al. (2017) e distribuídas em dois grupos de acordo com a época de instalação dos experimentos (Tabela 2). Plantas de *Raphanus raphanistrum* foram utilizadas como controle positivo.

As plantas daninhas foram semeadas em bandejas de Isopor[®] de 128 células contendo substrato organo-mineral (Tropstrato HT; Mogi Mirim) e mantidas em casa de vegetação (temperatura 22 – 28 °C e umidade relativa 60 – 90 %). Por volta de 15 dias após a germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos de 2 L contendo substrato constituído de areia grossa lavada, terra de barranco e substrato organo-mineral (1:1:1), suplementado com 0,6 kg de sulfato de amônio, 1,7 kg de superfosfato simples, 0,6 kg de cloreto de potássio e 0,8 kg de calcário dolomítico para cada m³ da mistura.

Tabela 2 - Plantas daninhas utilizadas nos experimentos de sobrevivência endofítica do isolado 3098C de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Família botânica	Nome científico	Nome comum	Grupo
Amaranthaceae	<i>Amaranthus viridis</i>	Caruru de mancha	1
	<i>Alternanthera tenella</i>	Apaga fogo	2
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	Picão preto	2
	<i>Conyza bonariensis</i>	Buva	1
	<i>Galinsoga parviflora</i>	Picão branco	1
	<i>Sonchus oleraceus</i>	Serralha	2
	<i>Emilia fosbergii</i>	Falsa serralha	1
	<i>Gnaphalium purpureum</i>	Macela	1
	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Nabiça	1 e 2
Brassicaceae	<i>Lepidium virginicum</i>	Mentruz	1
	<i>Coronopus didymus</i>	Mentruz rasteiro	2
Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis</i>	Trapoeiraba	1
Convolvulaceae	<i>Ipomoea triloba</i>	Corda de viola	1
Cucurbitaceae	<i>Luffa aegyptiaca</i>	Bucha	2
Cyperaceae	<i>Cyperus rotundus</i>	Tiririca	2
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Leiteira	1
Fabaceae	<i>Senna obtusifolia</i>	Fedegoso	2
Lamiaceae	<i>Leonurus sibiricus</i>	Rubim	2
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	Guanxuma	2
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i>	Beldroega	1
Rubiaceae	<i>Richardia brasiliensis</i>	Poaia	2
Solanaceae	<i>Nicandra physalodes</i>	Joá de capote	1
	<i>Solanum americanum</i>	Maria preta	2

1.2.2.2 Instalação dos experimentos

Os experimentos foram instalados em 03/10/2017 (Experimento 1, grupo 1 de plantas daninhas), 21/04/2018 (Experimento 2, grupo 2 de plantas daninhas), 22/09/2018 (Experimento 3, grupos 1 e 2 de plantas daninhas) e 28/03/2019 (Experimento 4, grupos 1 e 2 de plantas daninhas).

A inoculação das plantas daninhas foi realizada 35 dias após o transplante, empregando-se uma suspensão bacteriana padronizada (10^7 UFC mL⁻¹) [obtido de uma suspensão 10^8 UFC mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,1)] do isolado 3098C de Xcc. Foram utilizados dois métodos de inoculação: 1) pulverização da suspensão bacteriana na parte aérea das plantas daninhas até o ponto de escoamento utilizando-se um pulverizador manual (pressão máxima de trabalho 3,5 bar); 2) ferimentos na parte aérea das plantas com agulhas múltiplas seguido pela pulverização da suspensão até o ponto de escoamento.

As avaliações ocorreram aos 14, 28 e 42 dias após a inoculação, sendo amostradas a parte aérea de três plantas de cada espécie, que foram selecionadas ao acaso em cada período de avaliação. As plantas coletadas foram seccionadas em pequenos fragmentos com tesoura previamente flambada, acomodadas em sacos plásticos de 2 L e levadas ao laboratório para o processamento.

1.2.2.3 Processamento das amostras, isolamento e preservação de colônias bacterianas

As amostras de plantas daninhas foram homogeneizadas e 10 g foram submetidos a desinfecção superficial em álcool 70 % (30 segundos) e hipoclorito de sódio a 2 % (60 segundos), seguido de três lavagens em água destilada esterilizada. Posteriormente, os fragmentos foram triturados em 100 mL de PBS esterilizado, com o auxílio de equipamento tipo Turrax. Os extratos obtidos foram plaqueados (100 µL) em triplicata no meio NSAR, suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de clorotalonil e 50 µg.mL⁻¹ de tiofanato metílico (NSARF). As placas de Petri foram incubadas a 28 °C por 72 h e avaliadas quanto a presença qualitativa de colônias de Xcc. Colônias puras semelhantes a *Xanthomonas* foram selecionadas, cultivadas em caldo nutriente e preservadas em glicerol (- 80 °C), para posterior caracterização.

1.2.4 Delineamento experimental e análise dos dados

As plantas daninhas coletadas foram agrupadas em função da detecção de Xcc em cada região produtora, levando-se em consideração o número de vezes em que foram coletadas e o número de recuperações da bactéria na filosfera.

Para os experimentos de sobrevivência endofítica de Xcc, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições por espécie de planta daninha. Cada repetição foi representada por um vaso contendo três plantas. Dados obtidos nos experimentos foram agrupados por espécie, experimento e método de inoculação. Um intervalo de sobrevivência foi obtido para cada espécie nos dois métodos de inoculação, considerando os maiores e menores períodos de sobrevivência observados nos quatro experimentos.

1.2.5 Caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Os isolados obtidos dos levantamentos realizados no campo juntamente com os isolados dos experimentos de sobrevivência endofítica, foram submetidos a testes de

patogenicidade em plantas de couve manteiga cv. Geórgia e PCR com iniciadores específicos para Xcc.

Plântulas de couve manteiga foram obtidas em bandejas de Isopor® 128 células e transplantadas para copos de polietileno de 500 mL (composição do substrato descrita no item 1.2.2.1) 15 dias após a emergência. A inoculação dos isolados foi realizada sete dias após o transplante das plântulas, via técnica de incisão em folhas com tesoura previamente mergulhada nas suspensões bacterianas [10^8 UFC mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,1)]. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação (temperatura 22 – 28 °C e umidade relativa 60 – 90 %) até o aparecimento de sintomas e, posteriormente, realizado o reisolamento da bactéria em nutriente sacarose ágar (NSA). Como controle negativo foram utilizadas plantas de couve pulverizadas com água destilada esterilizada.

Para a PCR os isolados foram cultivados em NSA a 28 °C por 48 h. Posteriormente, porções de colônias foram transferidas para tubos de 200 µL contendo 100 µL de água Milli-Q® para obtenção das suspensões bacterianas 10^8 UFC mL⁻¹. A extração do DNA foi realizada por Kit (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações da fabricante.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µL, sendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 8,5 µL de água Milli-Q®, 3,0 µL de DNA bacteriano e 0,5 µL de cada um dos iniciadores HrcCF2 (5'-CGTGTGGATGTGCAGACC-3') e HrcCR2 (5'-CAGATCTGTCTGATCGGTGTCG-3'), que amplificam um fragmento de 519 pb do gene *hrcC* associado à patogenicidade de Xcc em brássicas (ZACCARDELLI et al., 2007). O programa no termociclador consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 95 °C por 1 minuto para a desnaturação, 58 °C por 30 segundos para o anelamento e 72 °C por 1 minuto para extensão, seguido de uma extensão final a 72 °C por 15 minutos (ZACCARDELLI et al., 2007).

Os produtos das amplificações foram submetidas a eletroforese horizontal (6 V/cm⁻¹) em gel de agarose 1% (p/v) contendo brometo de etídio como intercalante de DNA (4 µL / 100 mL), sendo os géis depositados em cuba sob tampão TBE 1 x (90 mM Tris, pH 8,3, 90 mM de ácido bórico e 0,1 mM de EDTA). Posteriormente, os géis foram visualizados sobre luz UV no fotodocumentador (BioDoc-It™ Imaging System, UVP, UK) e os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados com a escala do marcador molecular DNA Plus de 1 Kb (Invitrogen, EUA). O isolado 3098C foi utilizado

como controle positivo para a PCR e um isolado de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* como controle negativo.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em plantas daninhas coletadas em campos de cultivo de brássicas

No total foram coletadas 30 espécies de plantas daninhas, pertencentes a 14 famílias botânicas (Tabela 3). Xcc foi recuperada da filosfera de *Sonchus oleraceus*, *Galinsoga parviflora*, *Bidens* spp., (Asteraceae), *Raphanus sativus*, *Coronopus didymus*, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae), *Commelina* spp., (Commelinaceae), *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae), *Oxalis oxypetala* (Oxalidaceae) e *Polygonum persicaria* (Polygonaceae) nas regiões 1 e 2.

Na região 1, Xcc foi recuperada em *Amaranthus* spp., *Chenopodium quinoa* (Amaranthaceae), *Ageratum conyzoides* (Asteraceae), *Ipomoea* spp. (Convolvulaceae), *Cyperus* spp. (Cyperaceae), *Plantago tomentosa* (Plantaginaceae), *Eleusine indica* (Poaceae), *Rumex crispus* (Poligonaceae), *Portulaca oleracea* (Portulacaceae), *Solanum americanum* e *Nicandra physalodes* (Solanaceae). Já na região 2, a bactéria foi detectada apenas em *Emilia fosbergii*, *Artemisia verlotorum* (Asteraceae), *Veronica persica* (Plantaginaceae) e *Digitaria sanguinalis* (Poaceae). Xcc não foi recuperada da filosfera das demais espécies de plantas daninhas coletadas em ambas regiões.

Tabela 3 - Detecção natural de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera de plantas daninhas coletadas em seis campos de cultivo de brássicas

Família	Espécie	Região 1								Região 2								Presença de Xcc ³
		Pardinho		Botucatu		São Manuel		Total		Ibiúna (C1)		Ibiúna (C2)		Piedade		Total		
		N.C. ¹	N.D. ²	N.C.	N.D.	N.C.	N.D.	N.C.	N.D.	N.C.	N.D.	N.C.	N.D.	N.C.	N.D.	N.C.	N.D.	
Asteraceae	<i>Sonchus oleraceus</i>	10	3	4	2	3	0	17	5	5	0	3	1	1	0	9	1	+
Asteraceae	<i>Galinsoga parviflora</i>	11	1	7	2	6	0	24	3	5	1	4	2	3	0	12	3	+
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	6	1	3	1	4	0	13	2	3	2	3	1	1	1	7	4	+
Brassicaceae	<i>Coronopus didymus</i>	1	0	5	1	2	0	8	1	5	2	5	2	3	1	13	5	+
Asteraceae	<i>Bidens</i> spp.	9	1	2	1	4	0	15	2	4	3	1	0	0	0	5	3	+
Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i> spp.	10	4	5	0	4	0	19	4	5	0	2	0	0	0	7	0	+
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>	6	3	1	0	0	0	7	3	2	1	2	1	1	0	5	2	+
Commelinaceae	<i>Commelina</i> spp.	7	2	1	0	0	0	8	2	2	1	1	0	0	0	3	1	+
Oxalidaceae	<i>Oxalis oxyptera</i>	7	1	4	1	5	0	16	2	4	1	0	0	2	0	6	1	+
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i>	4	1	4	2	0	0	8	3	0	0	0	0	1	0	1	0	+
Solanaceae	<i>Nicandra physalodes</i>	10	2	3	1	5	0	18	3	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	3	0	7	0	6	2	16	2	0	0	1	0	0	0	1	0	+
Asteraceae	<i>Emilia fosbergii</i>	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	1	1	0	0	1	1	+
Lamiaceae	<i>Leonurus sibiricus</i>	7	1	3	0	0	0	10	1	2	0	2	1	0	0	4	1	+
Plantaginaceae	<i>Plantago tomentosa</i>	2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	1	0	+
Poaceae	<i>Eleusine indica</i>	5	2	3	0	3	0	11	2	2	0	0	0	0	0	2	0	+
Polygonaceae	<i>Rumex crispus</i>	4	2	0	0	0	0	4	2	0	0	3	0	1	0	4	0	+
Polygonaceae	<i>Polygonum persicaria</i>	1	1	2	0	2	0	5	1	4	1	3	0	1	0	8	1	+
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i>	3	2	3	0	1	0	7	2	1	0	1	0	0	0	2	0	+
Asteraceae	<i>Ageratum conyzoides</i>	1	1	2	0	1	0	4	1	0	0	1	0	0	0	1	0	+
Asteraceae	<i>Artemisia verlotorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	2	1	+
Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i> spp.	4	1	1	0	1	0	6	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+
Cyperaceae	<i>Cyperus</i> spp.	3	1	5	0	5	0	13	1	2	0	1	0	1	0	4	0	+
Plantaginaceae	<i>Veronica persica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0	4	1	+
Poaceae	<i>Digitaria sanguinalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	+
Asteraceae	<i>Conyza bonariensis</i>	0	0	1	0	2	0	3	0	2	0	0	0	1	0	3	0	-
Asteraceae	<i>Gnaphalium purpureum</i>	0	0	4	0	2	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i>	1	0	0	0	2	0	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	-
Polygonaceae	<i>Polygonum aviculare</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	3	0	-
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	4	0	-

¹N.C., números de coletas da planta daninha no campo de cultivo; ²N.D., números de detecções de Xcc na filosfera da planta daninha coletada; ³ Resultado geral da presença de Xcc na filosfera das plantas daninhas (+ = presença, - = ausência).

Com relação às plantas daninhas com sintomas supostamente associados à podridão negra (amarelecimento e/ou necrose foliar), foram coletadas 12 espécies de 7 famílias botânicas (Tabela 4). Xcc foi isolada de *Ipomoea nil* (Convolvulaceae), *Lepidium virginicum*, *Coronopus didymus*, *Raphanus raphanistrum*, *Raphanus sativus* (Brassicaceae), *Galinsoga parviflora*, *Bidens pilosa* e *Sonchus oleraceus* (Asteraceae).

Tabela 4 - Isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de plantas daninhas sintomáticas coletadas em seis propriedades

Família	Espécie	Região 1			Região 2			Presença de Xcc
		Pardinho	Botucatu	São Manuel	Ibiúna (C1)	Ibiúna (C2)	Piedade	
Convolvulaceae	<i>Ipomoea nil</i>	¹ 01/01	NC	NC	NC	NC	NC	+
Brassicaceae	<i>Lepidium virginicum</i>	01/01	NC	NC	NC	NC	NC	+
Brassicaceae	<i>Coronopus didymus</i>	01/00	01/00	01/00	01/01	01/01	01/01	+
Asteraceae	<i>Ageratum conyzoides</i>	² NC	01/00	NC	NC	NC	NC	-
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>	04/03	NC	01/00	NC	01/01	02/01	+
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	01/01	01/00	01/00	01/01	01/00	NC	+
Asteraceae	<i>Galinsoga parviflora</i>	03/02	02/02	NC	NC	NC	01/00	+
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	01/01	NC	01/00	NC	NC	NC	+
Solanaceae	<i>Sonchus oleraceus</i>	01/01	NC	NC	NC	NC	NC	+
Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis</i>	01/00	NC	NC	NC	NC	NC	-
Lamiaceae	<i>Leonurus sibiricus</i>	01/00	NC	NC	NC	NC	NC	-
Oxalidaceae	<i>Oxalis oxyptera</i>	01/00	NC	NC	NC	NC	NC	-

¹Números de plantas coletadas/ número de plantas positivas para Xcc; ² Planta daninha não coletada (NC);

³Resultado geral do isolamento de Xcc das plantas daninhas (+ = presença, - = ausência).

1.3.2 Sobrevivência endofítica de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em plantas daninhas em casa de vegetação

Xcc foi recuperada de todas as plantas daninhas avaliadas, porém os períodos sobrevivência endofítica variaram entre as espécies (Tabela 5). Na ausência de ferimentos (A.F.) a bactéria sobreviveu por até 42 dias em *Bidens pilosa*, *Commelina benghalensis*, *Coronopus didymus*, *Lepidium virginicum*, *Senna obtusifolia*, *Luffa aegyptiaca*, *Raphanus raphanistrum*, *Cyperus rotundus*, *Alternanthera tenella*, *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea triloba*, *Nicandra physalodes*, *Galinsoga parviflora* e *Sonchus oleraceus*. Baixa sobrevivência endofítica de Xcc, por até 14 dias, ocorreu em *Emilia fosbergii* e *Sida rhombifolia*. Em *Amaranthus viridis*, *Portulaca oleracea*, *Richardia brasiliensis*, *Leonurus sibiricus*, *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium purpureum* e *Solanum americanum* a bactéria apresentou sobrevivência moderada com período de até de 28 dias.

Tabela 5 - Sobrevivência endofítica de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em 23 espécies de plantas daninhas utilizando duas metodologias de inoculação

Família	Nome científico	Grupo	Experimentos 1 e 2		Experimento 3		Experimento 4		Intervalos	
			A.F. ¹	P.F. ²	A.F.	P.F.	A.F.	P.F.	A.F.	P.F.
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	2	42	42	42	42	42	42	42 - 42	42 - 42
Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis</i>	1	42	42	42	42	42	42	42 - 42	42 - 42
Brassicaceae	<i>Coronopus didymus</i>	2	42	42	42	42	42	42	42 - 42	42 - 42
Brassicaceae	<i>Lepidium virginicum</i>	1	28	42	42	42	42	42	28 - 42	42 - 42
Fabaceae	<i>Senna obtusifolia</i>	2	42	14	28	28	42	42	28 - 42	14 - 42
Cucurbitaceae	<i>Luffa aegyptiaca</i>	2	14	0	42	42	42	42	14 - 42	0 - 42
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>	1 e 2	14	28	42	42	42	42	14 - 42	28 - 42
Cyperaceae	<i>Cyperus rotundus</i>	2	42	42	28	28	14	42	14 - 42	28 - 42
Amaranthaceae	<i>Alternanthera tenella</i>	2	0	0	28	28	42	14	0 - 42	0 - 28
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i>	1	0	42	28	14	42	28	0 - 42	14 - 42
Amaranthaceae	<i>Amaranthus viridis</i>	1	0	28	28	28	28	0	0 - 28	0 - 28
Convolvulaceae	<i>Ipomoea triloba</i>	1	0	28	42	42	14	42	0 - 42	28 - 42
Solanaceae	<i>Nicandra physalodes</i>	1	0	0	42	28	14	28	0 - 42	0 - 28
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i>	1	14	0	28	42	14	0	14 - 28	0 - 42
Rubiaceae	<i>Richardia brasiliensis</i>	2	14	42	28	14	14	28	14 - 28	14 - 42
Asteraceae	<i>Galinsoga parviflora</i>	1	0	0	42	42	0	28	0 - 42	0 - 42
Lamiaceae	<i>Leonurus sibiricus</i>	2	28	14	14	28	0	42	0 - 28	14 - 42
Asteraceae	<i>Sonchus oleraceus</i>	2	0	14	42	42	0	28	0 - 42	14 - 42
Asteraceae	<i>Conyza bonariensis</i>	1	0	0	28	28	0	0	0 - 28	0 - 28
Asteraceae	<i>Emilia fosbergii</i>	1	0	42	14	42	14	42	0 - 14	42 - 42
Asteraceae	<i>Gnaphalium purpureum</i>	1	0	0	28	42	0	28	0 - 28	0 - 42
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i>	2	0	14	28	28	0	42	0 - 28	14 - 42
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	2	0	28	0	14	14	42	0 - 14	14 - 42

¹A.F., ausência de ferimentos; ²P.F., presença de ferimentos.

Na presença de ferimentos Xcc foi capaz de sobreviver por até 42 dias em *Bidens pilosa*, *Commelina benghalensis*, *Coronopus didymus*, *Lepidium virginicum*, *Emilia fosbergii*, *Raphanus raphanistrum*, *Cyperus rotundus*, *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea triloba*, *Richardia brasiliensis*, *Leonurus sibiricus*, *Sonchus oleraceus*, *Solanum americanum*, *Sida rhombifolia*, *Luffa aegyptiaca*, *Portulaca oleracea*, *Galinsoga parviflora* e *Gnaphalium purpureum*. Xcc apresentou sobrevivência endofítica moderada em *Alternanthera tenella*, *Amaranthus viridis*, *Nicandra physalodes* e *Conyza bonariensis*, com período de até 28 dias.

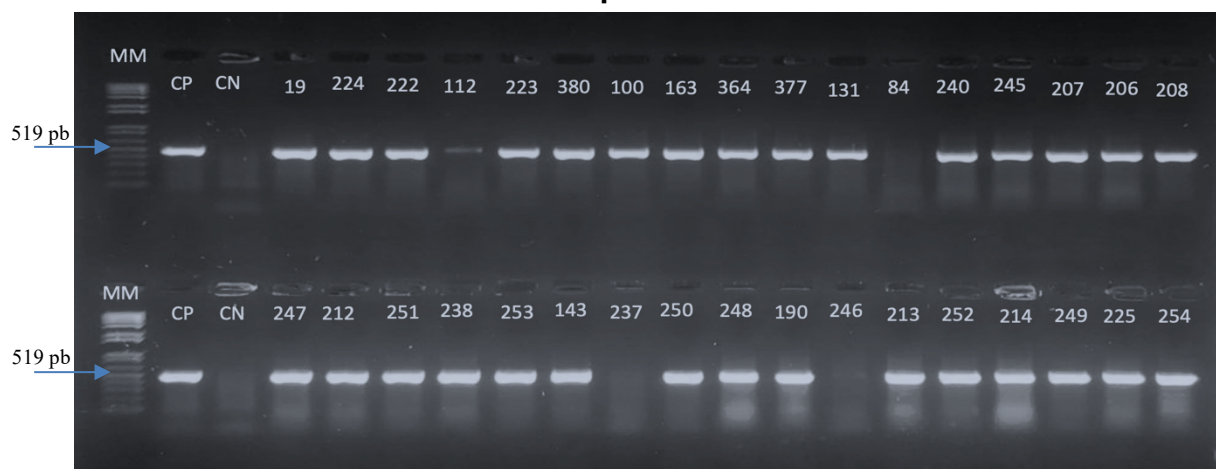
1.3.3 Caracterização dos isolados bacterianos

Os isolados obtidos das plantas daninhas coletadas em campos de cultivo, juntamente com os isolados dos experimentos de sobrevivência endofítica, foram patogênicos a plantas de couve manteiga (Figura 1) e foram caracterizados como Xcc por PCR (Figura 2).

Figura 1 - Teste de patogenicidade dos isolados em plantas de couve manteiga cv. Geórgia



Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1% resultante das amplificações dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilizando iniciadores específicos



MM - Marcador Molecular, 1Kb Plus Invitrogen®; CP - Controle positivo, isolado 3098C; CN - Controle negativo, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens*; 19 - *Bidens pilosa*, (endofítico), 224 - *Amaranthus* spp. (filosfera), 222 - *Artemisia verlotorum* (filosfera), 112 - *Datura stramonium* (filosfera), 223 - *Digitaria sanguinalis* (filosfera), 380 - *Plantago tomentosa* (filosfera), 100 - *Galinsoga parviflora* (endofítico), 163 - *Coronopus didymus* (endofítico), 364 - *Raphanus raphanistrum* (hospedeira), 377- *Rumex crispus* (filosfera), 131- *Nicandra Physalodes* (endofítico), 84 - *Commelina benghalensis* (hospedeira), 240 - *Sonchus oleraceus* (filosfera), 245 - *Portulaca oleracea* (filosfera), 207 - *Emilia fosbergii* (filosfera), 206 - *Cyperus* spp. (filosfera), 208 - *Ageratum conyzoides* (filosfera), 247 - *Eleusine indica* (filosfera), 212 - *Solanum americanum* (filosfera), 251 - *Senna obtusifolia* (endofítico), 238 - *Coronopus didymus* (filosfera), 253 - *Euphorbia heterophylla* (endofítico), 143 - *Richardia brasiliensis* (endofítico), 237 - *Oxalis oxyptera* (hospedeira), 250 - *Leonurus sibiricus* (filosfera), 248 - *Veronica p rsica* (filosfera), 190 - *Chenopodium quinoa* (filosfera), 246 - *Leonurus sibiricus* (hospedeira) , 213 - *Oxalis oxyptera* - (filosfera), 252 *Galinsoga parviflora* (hospedeira), 214 - *Cyperus rotundus* (endofítico), 249 - *Bidens pilosa* (endofítico), 225 *Raphanus raphanistrum* (filosfera), 254 - *Lepidium virginicum* (filosfera).

1.4 DISCUSSÃO

Diversas espécies de plantas daninhas foram descritas na literatura como reservatório de Xcc em países como Alemanha, EUA,  ndia e Nova Zelândia, principalmente espécies membros família Brassicaceae (SCHAAD; DIANESE, 1981; IGNATOV et al., 2007; KRAUTHAUSEN et al., 2018). Para as condições brasileiras, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que várias espécies de plantas daninhas de famílias botânicas distintas, são favoráveis a sobrevivência de Xcc e podem estar envolvidas na epidemiologia da podridão negra. Muitas dessas espécies também ocorrem nas culturas utilizadas em rotação com brássicas, e, portanto, devem ser controladas.

A filosfera é um ambiente adverso para a colonização por várias espécies de fitobactérias (BEATTIE; LINDOW, 1994; VORHOLT, 2012), porém é um nicho favorável a sobrevivência de Xcc (SCHAAD; DIANESE, 1981; ARIAS; NELSON; ALVAREZ, 2000), como demonstra os resultados aqui obtidos. Em condições naturais a bactéria foi recuperada da filosfera de 25 plantas daninhas. Algumas dessas

espécies inclusive, já haviam sido comprovadas favorecer a sobrevivência epifítica da bactéria em experimentos realizados a campo, através da inoculação artificial de Xcc, são elas: *Emilia fosbergii*, *Galinsoga parviflora*, *Sonchus oleraceus* (Asteraceae), *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae), *Nicandra physalodes* (Solanaceae), *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae), *Portulaca oleracea* (Portulacaceae), e algumas espécies dos gêneros *Bidens* spp., (Asteraceae), *Commelina* spp., (Commelinaceae) e *Ipomoea* spp., (Convolvulaceae) (SILVA et al., 2017).

Nos EUA e Índia, Xcc foi detectada em condições naturais na filosfera de *Lepidium virginicum* e *Centella asiatica*, respectivamente (SCHAAD; DIANESE, 1981; KISHUN; CHAND, 1988). Plantas de *Lepidium virginicum* estavam presentes em baixa população, e *Centella asiatica* não foi encontrada nas duas regiões avaliadas. Por outro lado, *Conyza bonariensis*, *Gnaphalium purpureum*, *Euphorbia heterophylla*, *Polygonum aviculare* e *Datura stramonium* foram amostradas nos campos de cultivos, mas não evidenciaram a presença da bactéria. Plantas de *Gnaphalium purpureum* e *Euphorbia heterophylla* foram consideradas favoráveis a sobrevivência de Xcc na filosfera, dependendo da condição ambiental (SILVA et al., 2017). Com relação a variação observada na composição florística de plantas daninhas entre as regiões avaliadas, pode ser explicada em função do tipo de solo, variabilidade genética das plantas, banco de sementes, clima e práticas agrícolas utilizadas (CHAUHAN et al., 2017; GAZOLA et al., 2018).

Comparando o número total de amostragens para cada espécie de planta daninha e o número total de recuperações de Xcc na filosfera durante os anos de 2017 e 2018 em ambas regiões, é possível observar que para algumas espécies o número de recuperações foi baixo comparado ao número de amostragens. Esse comportamento pode ser resultado de uma baixa população bacteriana presente na filosfera das plantas daninhas no período da amostragem, indetectável pela técnica de isolamento empregada. Além disso, mudanças na abundância e composição das populações bacterianas presentes na superfície das folhas são resultantes da soma de imigração, crescimento, morte e emigração, sendo direta ou indiretamente influenciados por fatores relacionados à planta, como a espécie vegetal, características das folhas e estágio fenológico, e o ambiente onde cresce, envolvendo área geográfica e as condições climáticas (KINKEL, 1997; HIRANO; UPPER, 2000; LEVEAU, 2018).

As práticas de manejo adotadas nos ambientes agrícolas como a adubação nitrogenada, aplicação de produtos químicos e biológicos para o controle de patógenos, pragas e plantas daninhas, entre outras práticas, também podem influenciar a comunidades bacterianas presentes na superfície da folha (RASTOGI; COAKER; LEVEAU, 2013). Durante as coletas, foi possível observar elevada incidência da podridão negra e infestação de plantas daninhas em alguns campos de cultivo, o que pode ter contribuído para a recuperação de Xcc da filosfera. Apesar do manejo de plantas daninhas ter sido realizado de forma mecânica e química nessas propriedades, algumas áreas ficaram abandonadas e infestadas por plantas daninhas após a colheita ou no final do ciclo da cultura. Resíduos das colheitas eram deixados sobre o solo até o plantio da próxima cultura, geralmente brássicas e a irrigação realizada por aspersão. Por outro lado, nos campos de cultivo onde se fazia um manejo mais efetivo, a incidência da podridão negra e infestação de plantas daninhas era menor, o que pode ter influenciado na recuperação de Xcc na filosfera das plantas daninhas.

Além de sobreviver na filosfera das plantas daninhas, Xcc pode penetrar por aberturas naturais e ferimentos, colonizar os feixes vasculares e causar doença (VICENTE; HOLUB, 2013). A partir das coletas realizadas nas duas regiões, Xcc foi isolada de *Coronopus didymus*, *Lepidium virginicum*, *Raphanus raphanistrum* e *Raphanus sativus*, membros da família Brassicaceae. Essas espécies já haviam sido descritas como hospedeiras da bactéria em levantamentos realizados nos EUA (SCHAAD; DIANESE, 1981; IGNATOV et al. 2007). Entretanto, *Coronopus didymus* e *Lepidium virginicum* não apresentaram sintomas visíveis de doença e foram consideradas como hospedeiras assintomáticas (SCHAAD; DIANESE, 1981). Plantas de *Ipomoea nil*, *Galinsoga parviflora*, *Bidens pilosa* e *Sonchus oleraceus*, pertencentes às famílias Asteraceae e Convolvulaceae, também foram identificadas como hospedeiras da bactéria. Na Alemanha, plantas de *Sonchus oleraceus* coletadas em campos de couve-flor com incidência da podridão negra foram identificadas como hospedeiras assintomáticas de Xcc (KRAUTHAUSEN et al., 2018).

Os sintomas observados nas plantas daninhas coletadas incluíam amarelecimento e/ou necrose foliar, supostamente associados à podridão negra. Em *Raphanus raphanistrum* e *Raphanus sativus*, também foram observadas lesões amarelas em forma “V” nas margens das folhas seguido por necrose, semelhantes aos sintomas descritos para essas espécies na literatura (SCHAAD; DIANESE, 1981;

IGNATOV et al., 2007). Comparando as regiões, é possível observar que um número maior de plantas daninhas sintomáticas foi identificado em Pardinho pertencente à região 1, o que pode ser explicado em razão do número de coletas e as práticas de manejo adotadas no campo de cultivo. As espécies identificadas como hospedeiras de Xcc neste trabalho, podem servir como fonte de inóculo e desempenhar importante papel na epidemiologia da podridão negra. A bactéria é facilmente disseminada de plantas daninhas infectadas para cultivos de brássicas e plantas daninhas não hospedeiras, como evidenciado em experimentos realizados à campo (SCHAAD; DIANESE, 1981; DANE; SHAW, 1996).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* também pode colonizar os tecidos internos das plantas daninhas e não causar manifestação visível de doença (KRAUTHAUSEN et al., 2018). Em condições controladas, a bactéria apresentou grande capacidade de sobrevivência endofítica, pois foi recuperada de todas as plantas daninhas e sobreviveu por longos períodos em várias espécies quando comparadas ao controle *Raphanus raphanistrum*. Sintomas de amarelecimento foram observados em *Raphanus raphanistrum* (controle positivo), *Coronopus didymus* e *Lepidium virginicum*, semelhantes aos verificados nas plantas coletadas dos campos de cultivo. Plantas de *Bidens pilosa*, *Galinsoga parviflora* e *Sonchus oleraceus* por outro lado, não apresentaram sintomas de doença. Esse resultado pode ser explicado em relação ao nível de agressividade do isolado (AGRIOS, 2005) e os fatores ambientais que influenciam a interação planta-endófito (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Comparando os resultados, é possível observar que a presença de ferimentos favoreceu a sobrevivência endofítica de Xcc em algumas das espécies avaliadas. Esse resultado já era esperado considerando o comportamento da bactéria. Para colonizar e estabelecer nos tecidos internos da planta, populações de Xcc presentes na filosfera devem penetrar por aberturas naturais como estômatos e hidatódios ou por ferimentos (HARDOIM et al., 2015; CERUTTI et al., 2017). Os estômatos, entretanto, podem fechar antecipadamente como um mecanismo de defesa, impedindo que esse processo ocorra (MELOTTO et al., 2006; UNDERWOOD; MELOTTO; HE, 2007). Os hidatódios, estruturas encontradas em várias espécies de plantas, apesar não fechar na presença da bactéria, podem inibir sua atividade através das respostas de defesa da planta pós-invasão (CERUTTI et al., 2017). A presença de ferimentos, entretanto, permite que Xcc penetre com maior facilidade nos tecidos,

sendo capaz de estabelecer como endófito ou patógeno, como observado nos experimentos aqui conduzidos.

Os resultados aqui obtidos são de grande importância para o manejo da podridão negra em áreas com cultivo de brássicas no Brasil. A recuperação de Xcc da filosfera de 25 espécies de plantas daninhas amostradas em campos de cultivo de brássicas, demonstrou o potencial dessas espécies como reservatório de inóculo, e que podem estar envolvidas na epidemiologia da podridão negra. Algumas delas inclusive foram identificadas como hospedeiras sintomáticas e favoráveis à sobrevivência endofítica da bactéria. Dessa maneira, o manejo dessas espécies é recomendado em áreas com cultivo de brássicas e nas culturas utilizadas em rotação.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005.
- ARIAS, R. S.; NELSON, S. C.; ALVAREZ, A. M. Effect of soil–matric potential and phylloplanes of rotation-crops on the survival of a bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 2, p. 109-116, 2000.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Epiphytic fitness of phytopathogenic bacteria: physiological adaptations for growth and survival. *In*: DANGL, J. L. (ed.). **Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals**. Berlin: Springer, 1994. cap. 1, p. 1-27.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 145-172, 1995.
- BULL, C. T. et al. Plant pathogenic prokaryotes. *In*: OWNLEY, B. H.; TRIGIANO, R. N. (ed.). **Plant pathology: concepts and laboratory exercises**. 3. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2016. cap. 5, p. 81-101.
- CERUTTI, A. et al. Immunity at cauliflower hydathodes controls systemic infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 174, n. 2, p. 700-716, 2017.
- CHAUHAN, B. S. et al. Emerging challenges and opportunities for education and research in weed science. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 8, n. 1537, p. 1-13. 2017.
- DANE, F.; SHAW, J. J. Survival and persistence of bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on host and non-host plants in the field environment. **Journal of Applied Bacteriology**, Chichester, v. 80, n. 1, p. 73-80, 1996.
- GAZOLA, T. et al. Phytosociology of weeds in off-season maize crops in the middle Paranapanema. **Planta daninha**, Jaboticabal, v. 36, p. 1-11, 2018.
- GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1992.
- HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.
- HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 624-653, 2000.
- IGNATOV, A. et al. Genetic diversity in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cruciferous weeds in Central Coastal California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 7, p. 803-812, 2007.

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

KARIMI, K.; ARZANLOU, M.; PERTOT, I. Weeds as potential inoculum reservoir for *Colletotrichum nymphaeae* causing strawberry anthracnose in iran and Rep-PCR Fingerprinting as useful marker to differentiate *C. acutatum* complex on strawberry. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, n. 129, p. 1-13, 2019.

KINKEL, L. L. Microbial population dynamics on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v. 35, n. 1, p. 327-347, 1997.

KISHUN, R.; CHAND, R. Epiphytic survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on *Centella asiatica* (L.) Urban. **International Journal of Tropical Plant Diseases**, Jodhpur, v. 6, n. 2, p. 189-193, 1988.

KRAUTHAUSEN, H. J. et al. Competence of *Xanthomonas campestris* from cruciferous weeds and wallflower (*Erysimum cheiri*) to Induce black rot in cabbage. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 151, n. 2, p. 275-289, 2018.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

LEVEAU, J. H. J. Microbial communities in the phyllosphere. In: ROBERTS, J. A. (ed.). **Annual Plant Reviews book series**. Chichester: John Wiley & Sons, 2018. cap. 11, p. 334-367.

LEYNS, F. et al. The host range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review**, New York, v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.

LIU, J. G. et al. The importance of light quality in crop–weed competition. **Weed Research**, Chichester, v. 49, p. 217-224, 2009.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

MARINGONI, A. C. **Técnicas em Fitobacteriologia**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2010.

MELOTTO, M. et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, Maryland Heights, v. 126, n. 5, p. 969-980, 2006.

RASTOGI, G.; COAKER, G. L.; LEVEAU, J. H. J. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 348, n. 1, p. 1-10, 2013.

ROMEIRO, S. R. Sobrevivência de bactérias fitopatogênicas e suas implicações. In: _____. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. cap. 12, p. 257-291.

SCHAAD, N. W.; DIANESE, J. C. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 11, p. 1215-1220, 1981.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; LACY, G. H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3. ed. Saint Paul: Aps Press, 2001. p. 175-200.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, n. 1, p. 199-221, 1974

SILVA, J. C. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of weeds. **Plant Pathology**, Chichester, v. 66, n. 9, p. 1517-1526, 2017.

UNDERWOOD, W.; MELOTTO, M.; HE, S. Y. Role of plant stomata in bacterial invasion. **Cellular Microbiology**, Chichester, v. 9, n. 7, p. 1621–1629, 2007.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 12, p. 828-840, 2012.

ZACCARDELLI, M. et al. Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene hrcC. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 118, n. 3, p. 299-306, 2007.

ZHAO, Y. F.; DAMICONE, J. P.; BENDER, C. L. Detection, survival, and sources of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 883-888, 2002.

CAPÍTULO 2 - OCORRÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* PV. *campestris* EM NABIÇA (*Raphanus raphanistrum* L.) NO BRASIL*

João César da Silva¹, Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior², José Marcelo Soman¹, Ricardo Marcelo Gonçalves³, Antonio Carlos Maringoni¹

¹Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Avenida Universitária, 3780, CEP: 18610-034, Botucatu, SP, Brasil; ²Universidade do Sagrado Coração - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG). Rua Irmã Armanda 10-50, CEP: 17011-160, Bauru, SP, Brasil. ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, Campus Santa Luzia, Rua Érico Veríssimo, 317, CEP: 33115-390, Santa Luzia, Brasil. E-mail: joaoacesar.silva@outlook.com

***Nota científica publicada na revista *Journal of Plant Pathology*, v. 101, p 411, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0179-7>.**

A nabiça (*Raphanus raphanistrum* L.) é considerada uma planta daninha importante em campos agrícolas, pois compete com as culturas por água, nutrientes e luz, além de atuar como hospedeira de patógenos e pragas. Populações resistentes a herbicidas têm dificultado o manejo dessa planta daninha (Heap, 2017), contribuindo para a sobrevivência de patógenos nos campos de cultivo durante a entressafra. Plantas de nabiça infectadas naturalmente por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), agente causal da podridão negra das brássicas, foram relatadas nos EUA (Schaad and Dianese, 1981). No Brasil, essa planta daninha é comum em campos cultivados de *Brassica* spp. com ocorrência de podridão negra. No entanto, até o momento, não foi descrita como hospedeira de Xcc. Durante 2016, plantas de nabiça com sintomas de amarelecimento e necrose marginal foliar foram coletadas em uma propriedade produtora de brássicas (*Brassica oleracea* var. *italica*) com histórico de podridão negra, localizada em Pardinho, São Paulo, Brasil. O isolamento bacteriano foi realizado em nutriente sacarose ágar (NSA) seguido de incubação a 28 °C por 48 h. A presença de colônias amarelas, mucóides e brilhantes, característica do gênero *Xanthomonas* foi observada. O isolado obtido (NAB3175), hidrolisou amido, foi patogênico a plantas de couve-flor (cultivar 'Teresópolis') e apresentou resultado

positivo de PCR usando os iniciadores específicos HrcCF2 e HrcCR2, que amplificaram um fragmento de 519 pb (Zaccardelli et al., 2007). A região do gene 16S rDNA do isolado Nab3175 foi amplificada por PCR usando os primers FD1 e RD1 (Weisburg et al. 1991) e sequenciada, sendo identificado pelo grau de similaridade com o GenBank (NCBI). O isolado Nab3175 (acesso N° MG993191) mostrou uma similaridade de nucleotídeo de 100% com o isolado Xcc ATCC 33913 (NR_074936.1), originalmente isolado de couve-de-bruxelas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) em 1957, Reino Unido. Para nosso conhecimento, este é o primeiro relato da ocorrência natural de Xcc em nabiça no Brasil.

Agradecimentos

O primeiro autor agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro (Número do processo FAPESP: 2017/13822-0)

Referências

- Heap I (2017) The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <http://www.weedscience.org/>. Acessado em 29 de outubro de 2017
- Schaad NW, Dianese JC (1981) Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology* 71:1215–1220
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703
- Zaccardelli M, Campanile F, Spasiano A, Merighi M (2007) Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene hrcC. *Eur J Plant Pathol* 118:299–306

CAPÍTULO 3 - SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* PV. *campestris* NA FILOSFERA E RIZOSFERA DE PLANTAS CULTIVADAS

João César da Silva, Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior, José Marcelo Soman, Daniele Maria do Nascimento, Luana Laurindo de Melo, Letícia Rodrigues Oliveira, Maria Márcia Pereira Sartori, Antonio Carlos Maringoni

RESUMO

A sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) foi avaliada na filosfera e rizosfera de 20 espécies de plantas cultivadas, assim como na rizosfera do repolho cultivado em seis tipos de solos. A parte aérea das plantas cultivadas foi inoculada e o solo infestado com suspensão bacteriana 10^7 UFC.mL⁻¹ do isolado 3098C de Xcc, resistente a rifampicina e patogênico a brássicas. A recuperação da bactéria das amostras foi realizada em meio de cultura semi-seletivo. Xcc sobreviveu por até 70 dias na filosfera do repolho, tomate, trigo, aveia preta, nabo forrageiro e pimentão, por até 63 dias na abóbora e mostarda, e por até 56 dias no feijão. Na rizosfera das plantas cultivadas, Xcc apresentou baixa sobrevivência na maioria das plantas avaliadas quando comparada com o solo na ausência de plantas. O maior período de sobrevivência na rizosfera foi observado no repolho (70 dias). Baixa sobrevivência de Xcc ocorreu na rizosfera do repolho cultivado em diferentes solos, sendo o maior período de sobrevivência observado no solo 4 (36 dias) de textura arenosa. Plantas de abobrinha, cebolinha, crotalária, espinafre, milho e sorgo, são recomendadas para rotação com brássicas, pois Xcc apresentou baixa sobrevivência na filosfera e rizosfera dessas culturas.

Palavras-chave: Podridão negra. Manejo. Rotação de culturas. Solo.

ABSTRACT

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc) survival was evaluated in the phyllosphere and rhizosphere of 20 crop species, as well as in cabbage rhizosphere, grown in six soil types. The aerial part of crops was inoculated and the soil was infested with bacterial suspension 10^7 UFC.mL⁻¹ of Xcc 3098C strain, resistant to rifampicin and pathogenic to brassica. The bacterium recovery from the samples was carried out in a semi-selective culture medium. Xcc survived for up to 70 days in cabbage, tomato, wheat, black oat, turnip and pepper phyllosphere, for up to 63 days in pumpkin and mustard, and for up to 56 days in beans. In crops rhizosphere, Xcc showed low survival in most of the evaluated plants when compared with soil without plants. The longest survival period in the rhizosphere was observed in cabbage (70 days). Low Xcc survival occurred in cabbage rhizosphere grown in different soils, with the longest survival period observed in soil 4 (36 days) with sandy texture. Zucchini, chives, crotalaria, spinach, corn and sorghum plants are recommended for brassica rotation, as Xcc showed low survival in the phyllosphere and rhizosphere of these crops.

Keywords: Black rot. Management. Crop rotation. Soil.

3.1 INTRODUÇÃO

A rotação de culturas é uma prática que contribui para a redução da ocorrência de doenças, pois interrompe o ciclo dos patógenos, reduz a quantidade inóculo e permite o declínio natural da população ao longo do tempo (DURY et al., 2012; PALTÍ, 2012; WEZEL et al., 2014). Essa prática é indicada para o manejo de patógenos que possuem mobilidade limitada, estreita gama de hospedeiros, e que são incapazes de sobreviver por longos períodos na ausência de um hospedeiro vivo (KARLEN et al., 1994; VAN BRUGGEN; GAMLIEL; FINCKH, 2016).

O sucesso da rotação de culturas no manejo de doenças depende do ciclo de vida e sobrevivência dos patógenos (ZEGADA-LIZARAZU; MONTI, 2011). Bactérias fitopatogênicas não formam estruturas de resistência e poucas espécies sobrevivem no solo (SUMNER, 1982; KADO, 2010). No entanto, muitas espécies sobrevivem em sementes, restos culturais, insetos, água de irrigação e em plantas cultivadas e daninhas (SCHUSTER; COYNE, 1974; HIRANO; UPPER, 1983; BULL et al., 2016). A rotação de culturas é recomendada para o manejo de bacterioses e deve ser empregada em combinação com outras práticas de manejo, mesmo para bactérias que sobrevivem por um curto período no solo e apresentam um número restrito de hospedeiros (CURL, 1963; SUMNER, 1982; GOTO, 1992; NEGASH; MULUALEM; FIKIRIE, 2018).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Pammel) Downson 1939 (Xcc), agente causal da podridão negra, é patogênica a várias espécies da família Brassicaceae (VICENTE; HOLUB, 2013). A bactéria possui baixa capacidade de sobrevivência no solo, porém é capaz de sobreviver por longos períodos em restos culturais (ARIAS; NELSON; ALVAREZ, 2000). Nos EUA, Xcc sobreviveu por 42 dias no solo durante o inverno, porém quando associada a restos vegetais, sobreviveu por até 244 dias (SCHAAD; WHITE, 1974). No Brasil, a bactéria sobreviveu 7 dias no solo e 255 dias em restos culturais de couve-flor (SILVA JÚNIOR et al., 2020). Xcc também foi detectada colonizando epifiticamente e endofiticamente plantas hospedeiras, não hospedeiras e plantas daninhas no campo (SCHAAD; DIANESE, 1981; DANE; SHAW, 1996).

A rotação de culturas é indicada para o manejo de Xcc (VICENTE; HOLUB, 2013). Nos EUA, a rotação de culturas foi recomendada por dois anos para reduzir o inóculo em áreas com histórico da doença (SCHAAD; WHITE, 1974). Já para as condições da Tailândia, apenas um ano de rotação foi considerado suficiente

(SCHAAD; THAVEECHAI, 1983). Poucas são as informações disponíveis na literatura sobre as espécies cultivadas que podem ser utilizadas em rotação, uma vez, que a cultura selecionada pode contribuir para a manutenção do inóculo no campo. Experimentos conduzidos no Havaí demonstraram que Xcc possui baixa capacidade de sobrevivência na filosfera do arroz, quando comparada ao repolho, e pode ser uma opção de rotação com brássicas (ARIAS; NELSON; ALVAREZ, 2000). A rizosfera das plantas cultivadas também é um importante nicho ecológico para várias espécies de microrganismos presentes no solo (PHILIPPOT et al., 2013; COMPANT et al., 2019), e talvez possa ser importante para Xcc.

No Brasil, apesar da rotação de culturas ser uma prática recomendada em áreas com histórico de podridão negra (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016), não há informações sobre as espécies que contribuam para reduzir o inóculo nessas áreas e o período de rotação. Neste trabalho foi avaliada a capacidade de sobrevivência de Xcc na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas, assim como na rizosfera do repolho cultivado em seis tipos de solos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Locais de condução dos experimentos e isolado bacteriano

Os experimentos de sobrevivência de Xcc na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas foram conduzidos a campo, e os experimentos de sobrevivência de Xcc na rizosfera do repolho cultivado em seis tipos de solos foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (UNESP), Botucatu, São Paulo.

Foi empregado nos experimentos o isolado 3098C de Xcc, resistente a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina e patogênico a plantas de brássicas, que foi previamente cultivado em nutriente sacarose ágar acrescido de rifampicina - NSAR [20 g.L^{-1} de nutriente ágar (Merck, Alemanha), 5 g.L^{-1} de sacarose (Synth, Brasil) e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina (Rifaldin)] e incubado a 28 °C, por 48 h. O isolado foi preservado em glicerol 30 % (v/v) e mantido a - 80°C para o uso nos experimentos.

3.2.2 Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas

3.2.2.1 Obtenção e cultivo das espécies cultivadas

Nos experimentos, foram utilizadas 20 espécies de plantas cultivadas pertencentes a 10 famílias botânicas (Tabela 1), selecionadas com base em sua importância e uso em sistemas de rotação com brássicas no país. Plantas de repolho foram utilizadas como controle. A semeadura foi realizada em vasos de 2 L contendo substrato constituído de terra de barranco, areia grossa lavada e substrato organo-mineral (Tropstrato HT; Mogi Mirim) na proporção 1:1:1, suplementado com 0,6 kg de sulfato de amônio, 1,7 kg de superfosfato simples, 0,6 kg de cloreto de potássio e 0,8 kg de calcário dolomítico para cada m³ da mistura. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação (temperatura 22 – 28 °C e umidade relativa 60 – 90 %), e levados para o campo 35 dias após a emergência.

Tabela 1 - Espécies de plantas cultivadas utilizadas nos experimentos de sobrevivência do isolado 3098C de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera e rizosfera

Família	Espécie	Nome comum
Amaranthaceae	<i>Spinacia oleracea</i>	Espinafre (híb. Popeye)
Amaryllidaceae	<i>Allium schoenoprasum</i>	Cebolinha (cv. Bella Catarina)
Apiaceae	<i>Daucus carota</i>	Cenoura (cv. Carandaí)
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i>	Alface (cv. Bolinha)
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	Girassol (cv. IAC Iarama)
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	Nabo (cv. IPR 116)
Brassicaceae	<i>Brassica juncea</i>	Mostarda (cv. Lisa da Flórida)
Brassicaceae	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Repolho (cv. Chato de Quintal)
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita moschata</i>	Abóbora (cv. Mini Paulista HT75)
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	Abobrinha (híb. La Belle)
Fabaceae	<i>Crotalaria juncea</i>	Crotalária (cv. IAC-1)
Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Feijão (cv. Pérola)
Fabaceae	<i>Glycine max</i>	Soja (cv. M5917 IPRO)
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão (cv. IAC 23)
Poaceae	<i>Avena sativa</i>	Aveia preta (cv. Embrapa 29)
Poaceae	<i>Zea mays</i>	Milho (híb. 2B587RR)
Poaceae	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo (cv. BRS374)
Poaceae	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo (cv. Al Precioso)
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate (híb. Tywama)
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i>	Pimentão (híb. Magali R)

3.2.2.2 Instalação dos experimentos

O experimento 1 foi instalado em 25/10/ 2017, o experimento 2 em 08/02/2018, o experimento 3 em 29/06/2018 e o experimento 4 em 19/10/2018. A parte aérea foi inoculada com suspensão bacteriana (10^7 UFC mL⁻¹) [previamente padronizada a 10^8 UFC mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,1)] até o ponto de escoamento, enquanto a infestação do solo foi realizada com 200 mL do inóculo. Vasos contendo apenas substrato, sem o cultivo de plantas, também foram infestados, para comparação da capacidade de sobrevivência de Xcc associada à rizosfera das plantas com o solo.

A população inicial da bactéria foi recuperada uma hora após a inoculação e a cada sete dias, durante dez semanas (70 dias) ou até a não recuperação de células viáveis das amostras (confirmadas em três recuperações sucessivas). Para o processamento, amostras de folhas e do solo aderido às raízes de três exemplares de cada espécie, selecionadas ao acaso, foram acondicionadas em sacos plásticos, homogeneizadas e levadas ao laboratório.

3.2.2.3 Processamento das amostras

A metodologia utilizada para o processamento das amostras de folhas foi adaptada de Gent, Lang e Schwartz (2005), na qual 10 g de folhas foram transferidas para frascos de Duran® contendo 200 mL de tampão fosfato-salina (PBS) 10 mM (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,9 g Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄, 1 L de água destilada esterilizada) pH 7,2 e agitados (200 rpm/ 30 min). Para o solo da rizosfera, 10 g foram transferidos para frascos de Duran®, adicionado 100 mL de PBS esterilizado e agitados (200 rpm/ 30 min), seguido por repouso de 30 minutos (SILVA et al., 2017).

Os sobrenadantes das suspensões foram diluídos em série (10^0 a 10^{-4}) e 100 µL plaqueados em triplicata no meio NSAR, suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de clorotalonil e 50 µg.mL⁻¹ de tiofanato metílico (NSARF), seguido de incubação (28 °C/ 72 h). Colônias semelhantes a Xcc foram quantificadas e os dados foram transformados em log₁₀ do número de UFC/g de tecido vegetal⁻¹, para a população da filosfera, e log₁₀ do número de UFC.g de solo seco⁻¹, para população da rizosfera.

3.2.2.4 Dados climáticos

Durante a condução dos experimentos as plantas foram irrigadas manualmente conforme a necessidade de água. Dados de temperatura máxima, mínima e média, umidade relativa e precipitação foram obtidos de uma estação meteorológica

localizada a 300 m da área experimental. A umidade do solo foi aferida para todas as espécies e períodos de recuperação, em balança com sensor de umidade por infravermelho (Gehaka, Modelo IV 2500, Brasil).

A partir dos dados obtidos, médias foram estabelecidas para as variáveis temperatura média, umidade relativa e umidade do solo, de acordo com os períodos de recuperação e a sobrevivência da bactéria na filosfera e rizosfera das plantas cultivadas. Para as variáveis temperatura máxima e mínima foram estabelecidos os pontos máximos e mínimos em cada período de recuperação. Os valores de precipitação foram obtidos pelo acumulado de chuva a cada sete dias.

3.2.3 Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na rizosfera do repolho cultivado em seis tipos de solos

3.2.3.1 Coleta e características dos solos

Seis solos foram coletados em áreas agrícolas sem histórico do cultivo de brássicas (Tabela 2). Os solos 1 e 4 foram coletados em uma propriedade do município de Bauru - SP; os solos 3 e 5 foram provenientes de propriedades na região de Pederneiras - SP; o solo 2 foi coletado na Fazenda Lageado da FCA/UNESP, Botucatu - SP; o solo 6 foi proveniente da mesma área onde foram conduzidos os experimentos descritos no item 3.2.2.

Os solos coletados foram depositados em caixas plásticas 70 × 35 × 35 cm (comprimento x largura x altura) e transportadas para a casa-de-vegetação. Posteriormente, foram peneirados em peneira de malha 8 (2,8 mm de abertura), secos em estufa durante sete dias, armazenados em caixas plásticas (abertura superior fechada com folhas de papel kraft) e mantidas na estufa até a instalação dos experimentos. As propriedades físico-químicas dos solos foram determinadas, conforme análises conduzidas junto ao Departamento de Solos e Recursos Ambientais da FCA/UNESP (Tabela 2).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos seis tipos de solos utilizados nos experimentos de sobrevivência do isolado 3098C de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na rizosfera de repolho

Solo	Areia total (g/kg)	Silte (g/kg)	Argila (g/kg)	Textura	pH (CaCl ₂)	Matéria Orgânica (g/dm ³)
1	800	133	67	Arenosa	5,2	10
2	638	107	255	Média	4,7	13
3	221	292	487	Argilosa	4,7	42
4	858	39	103	Arenosa	5,3	10
5	529	168	303	Média	5,4	31
6	761	43	196	Média	3,8	12

3.2.3.2 Instalação dos experimentos e processamento

Para a instalação dos experimentos e cultivo das plântulas de repolho (cv. Chato de Quintal) foram utilizados copos de poliestireno de 500 mL. Os copos foram preenchidos com 400 g de cada solo, sendo transplantada uma plântula de repolho, com 25 dias de emergência, em cada copo. As plântulas foram previamente obtidas do cultivo em bandeja de Isopor® de 128 células, contendo substrato organo-mineral (Tropstrato HT; Mogi Mirim) e mantidas em casa de vegetação (temperatura 22 – 28 °C e umidade relativa 60 – 90 %).

Foram instalados quatro experimentos em casa de vegetação. O experimento 5 foi instalado em 16/03/2018, o experimento 6 em 13/04/2018, o experimento 7 em 17/08/2018 e o experimento 8 em 28/03/2019. A infestação do solo foi realizada pela rega de 50 mL de suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL) [suspensão inicialmente padronizada a 10^8 UFC mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,1)].

A população inicial da bactéria foi recuperada uma hora após a inoculação e a cada quatro dias, durante seis semanas. Para as recuperações, foi utilizado o solo aderido às raízes das plantas de repolho de três copos, selecionados ao acaso, obtendo-se uma amostra composta para cada tratamento (tipos de solos). O processamento das amostras e a obtenção dos dados foram semelhantes às metodologias descritas no item 3.2.2.3.

3.2.4 Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento dos experimentos de sobrevivência de Xcc na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas foi em blocos ao acaso, com 10 repetições para cada espécie, sendo cada repetição representada por um vaso com três plantas. Os dados

obtidos foram agrupados por planta e experimento, e um intervalo de sobrevivência foi gerado para cada espécie, considerando os maiores e menores período de sobrevivência de Xcc na filosfera e rizosfera. Para os dados de população obtidos em cada período de recuperação de Xcc na filosfera e rizosfera, foi calculada a área abaixo da curva para o período de sobrevivência (AACS) e posteriormente um intervalo também foi gerado para cada espécie, considerando o maior e menor valor de AACS.

Para os experimentos de sobrevivência de Xcc na rizosfera de repolho, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos (seis tipos de solo) e 36 repetições. Os dados obtidos foram agrupados por solo e experimento, e um intervalo foi gerado, assim como também para os dados de população transformados em área abaixo da curva do período de sobrevivência (AACS). Dados de umidade do solo obtidos em cada período de recuperação foram calculados para o período total de sobrevivência da bactéria.

3.2.5 Caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* por PCR

Colônias semelhantes a Xcc foram selecionadas do meio NSARF, em todos os experimentos e períodos de sobrevivência, e cultivadas em NSA (28° C/ 48 h). Porções de colônias foram transferidas para tubos de 200 µL contendo 100 µL de água Milli-Q® para obtenção de suspensões (10^8 UFC.mL⁻¹). Os tubos foram levados ao termociclador (Eppendorf, Master cycler nexus gradient, EUA) e submetidos a um programa que aqueceu as suspensões a 95 °C, por 15 minutos, seguido por resfriamento, a 4 °C (SILVA et al., 2017).

Para as reações de PCR utilizou-se um volume total de 25 µL, sendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 8,5 µL de água Milli-Q®, 3,0 µL de DNA bacteriano e 0,5 µL dos iniciadores HrcCF2 (5'-CGTGTGGATGTGCAGACC-3') e HrcCR2 (5'CAGATCTGTCTGATCGGTGTCG-3'), responsáveis por amplificar um fragmento de 519 pb do gene hrcC, que está associado a patogenicidade de Xcc em plantas de brássicas (ZACCARDELLI et al., 2007). O programa utilizado no termociclador consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C (5 minutos), seguido por 30 ciclos a 95°C por 1 minuto (desnaturação), 58 °C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 1 minuto (extensão), seguido de uma extensão final a 72 °C por 15 minutos (ZACCARDELLI et al., 2007).

O produto das amplificações foi submetido a eletroforese horizontal (6 V/cm^{-1}) em gel de agarose a 1% (p/v), contendo brometo de etídio ($3 \mu\text{L} / 100 \text{ mL}$), sob tampão TBE 1 x (90 Mm Tris , pH 8,3, 90 mM de ácido bórico e $0,1 \text{ mM}$ de EDTA). Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador (BioDoc-ItTM Imaging System, UVP, UK), sendo o tamanho dos fragmentos comparado a escala do marcador DNA Plus de 1 Kb (Invitrogen, EUA). Como controle positivo para a PCR foi utilizado o isolado 3098C de Xcc, e um isolado de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* como controle negativo.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas

Xanthomonas campestris pv. *campestris* foi recuperada da filosfera de todas as plantas cultivadas, porém os períodos sobrevivência variaram entre as espécies (Tabela 3). Na filosfera do repolho a bactéria sobreviveu por 70 dias em todos os experimentos. Alta sobrevivência de Xcc também foi observada no tomate, trigo, abóbora, aveia preta, nabo forrageiro, pimentão, mostarda e feijão com períodos máximos de sobrevivência variando de 56 a 70 dias. Baixa sobrevivência de Xcc foi observada na filosfera do milho, sorgo, cebolinha, espinafre, abobrinha, crotalária e alface com períodos máximos de até 21 dias. Em soja, algodão, cenoura e girassol a bactéria apresentou sobrevivência moderada com períodos máximos variando de 35 a 42 dias.

Com relação à área abaixo da curva de sobrevivência (AACS) de Xcc na filosfera, o maior valor ocorreu na filosfera de repolho (476), enquanto para as demais espécies em que Xcc apresentou alta sobrevivência, os valores máximos variaram entre 183 e 329 (Tabela 3). Para as espécies com moderados períodos de sobrevivência, os valores máximos de AACS oscilaram entre 109 a 146. Os valores de AACS foram diretamente proporcionais aos períodos de sobrevivência de Xcc na filosfera, entretanto, espécies com períodos de sobrevivência iguais, apresentaram valores de AACS distintos. O milho foi a espécie que apresentou o menor valor de AACS (31), considerando o maior período de sobrevivência (7 dias).

Tabela 3 - Períodos de sobrevivência e área abaixo da curva de sobrevivência do isolado 3098C de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no filosfera de 20 espécies vegetais, em quatro experimentos

Planta Cultivada	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Intervalos
Repolho	70 ¹ (415) ²	70 (405)	70 (463)	70 (476)	70 - 70 (405 - 476)
Tomate	70 (292)	-	63 (297)	-	63 - 70 (292 - 297)
Trigo	56 (202)	-	70 (329)	-	56 - 70 (202 - 329)
Abóbora	63 (210)	-	63 (273)	-	63 - 63 (210 - 273)
Nabo forrageiro	42 (250)	-	70 (367)	-	42 - 70 (250 - 367)
Aveia preta	42 (138)	-	70 (372)	-	42 - 70 (138 - 372)
Pimentão	-	28 (120)	-	70 (253)	28 - 70 (120 - 253)
Mostarda	-	63 (235)	-	21 (114)	21 - 63 (114 - 235)
Feijão	14 (63)	-	56 (183)	-	14 - 56 (63 - 183)
Soja	-	28 (92)	-	35 (146)	28 - 35 (92 - 146)
Algodão	-	7 (35)	-	42 (138)	7 - 42 (35 - 138)
Girassol	-	7 (62)	-	35 (109)	7 - 35 (62 - 109)
Cenoura	< 7 (12)	-	35 (126)	-	< 7 - 35 (12 - 126)
Alface	14 (62)	-	21 (75)	-	14 - 21 (62 - 75)
Crotalária	-	21 (68)	-	14 (50)	14 - 21 (50 - 68)
Abobrinha	-	14 (69)	-	14 (59)	14 - 14 (59 - 69)
Espinafre	-	14 (65)	-	14 (59)	14 - 14 (65 - 59)
Cebolinha	-	14 (50)	-	14 (49)	14 - 14 (49 - 50)
Sorgo	-	< 7 (18)	-	21 (84)	< 7 - 21 (18 - 84)
Milho	< 7 (16)	-	7 (31)	-	< 7 - 7 (16 - 31)

¹Período de sobrevivência (dias); ²Área abaixo da curva de sobrevivência (AACS) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* apresentou baixa sobrevivência na rizosfera da maioria das plantas cultivadas quando comparada com o solo na ausência de plantas, onde sobreviveu por até 42 dias (Tabela 4). O maior período de sobrevivência da bactéria ocorreu no repolho, 70 dias. Em abóbora e trigo o período máximo de sobrevivência de Xcc na rizosfera foi semelhante ao observado no solo. Sobrevivência moderada da bactéria ocorreu na rizosfera da alface, mostarda e feijão com períodos máximos variando entre 28 a 35 dias, porém inferiores ao solo. Baixa sobrevivência de Xcc foi observada na rizosfera das demais espécies avaliadas (tomate, nabo forrageiro, abobrinha, girassol, aveia preta, milho, espinafre, crotalária, cebolinha, soja, algodão, pimentão, cenoura e sorgo).

Na rizosfera, o maior valor de área abaixo da curva de sobrevivência (AACS) ocorreu no repolho, 284 (Tabela 4). Para abóbora e trigo os valores máximos de AACS variaram entre 107 e 126, porém foram inferiores ao solo (142). Na rizosfera de alface, mostarda e feijão, os valores máximos de AACS oscilaram de 102 a 106 e foram diretamente proporcionais aos períodos de sobrevivência de Xcc rizosfera. O menor valor de AACS ocorreu na rizosfera de plantas de sorgo.

Os dados climáticos registrados durante os experimentos e agrupados de acordo com os períodos de recuperação de Xcc na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas, evidenciaram que nos experimentos 1, 3 e 4 as precipitações foram frequentes, com temperaturas médias mínimas acima de 12,7 °C e temperatura médias máximas abaixo de 33,7 °C, e valores de umidade relativa variando de 53,4 a 92,0 % (Tabelas 5 e 6). No experimento 2, as precipitações não foram frequentes, com valores de temperatura médias mínimas acima de 7 °C e temperatura médias máximas abaixo de 31,3 °C, e umidade relativa variando de 43,0 a 88,9 %.

Tabela 4 - Períodos de sobrevivência e área abaixo da curva de sobrevivência do isolado 3098C de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na rizosfera de 20 espécies vegetais, em quatro experimentos

Espécie	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Intervalos
Repolho	14 ¹ (65) ²	56 (236)	70 (284)	70 (238)	14 - 70 (65 - 284)
Abóbora	14 (57)	-	42 (126)	-	14 - 42 (57 - 126)
Alface	21 (74)	-	35 (106)	-	21 - 35 (74 - 106)
Trigo	7 (34)	-	42 (107)	-	7 - 42 (34 - 107)
Mostarda	-	28 (102)	-	14 (66)	14 - 28 (66 - 102)
Feijão	< 7 (21)	-	35 (104)	-	< 7 - 35 (21 - 104)
Tomate	14 (60)	-	14 (65)	-	14 - 14 (60 - 65)
Nabo forrageiro	14 (64)	-	7 (46)	-	7 - 14 (46 - 64)
Abobrinha	-	21 (82)	-	< 7 (20)	< 7 - 21 (20 - 82)
Girassol	-	21 (74)	-	< 7 (20)	< 7 - 21 (20 - 74)
Aveia preta	14 (49)	-	7 (37)	-	7 - 14 (37 - 49)
Milho	< 7 (21)	-	14 (60)	-	< 7 - 14 (21 - 60)
Espinafre	-	7 (36)	-	7 (40)	7 - 7 (36 - 40)
Crotalária	-	14 (53)	-	< 7 (19)	< 7 - 14 (19 - 53)
Cebolinha	-	< 7 (19)	-	7 (42)	< 7 - 7 (19 - 42)
Soja	-	7 (34)	-	< 7 (20)	< 7 - 7 (20 - 34)
Algodão	-	7 (35)	-	< 7 (19)	< 7 - 7 (19 - 35)
Pimentão	-	7 (35)	-	< 7 (20)	< 7 - 7 (20 - 35)
Cenoura	< 7 (22)	-	< 7 (20)	-	< 7 - < 7 (20 - 22)
Sorgo	-	< 7 (19)	-	< 7 (19)	< 7 - < 7 (19 - 19)
Solo	21 (86)	< 7 (19)	42 (142)	< 7 (20)	< 7 - 42 (19 - 142)

¹Período de sobrevivência (dias); ²Área abaixo da curva de sobrevivência (AACS) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Tabela 5 - Temperaturas máxima, média e mínima (°C), umidade relativa (%), precipitação (mm) e umidade do solo (%) ocorridas durante a condução dos experimentos de sobrevivência do isolado 3098C de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas (experimentos 1 e 2)

Experimento 1						
Período	Temp. máxima (°C)	Temp. mínima (°C)	Temp. média (°C)	Umidade Relativa (%)	Precipitação (mm)	Umidade do solo (%)
0	31,4	16,0	22,3	73,6	0,0	16,1
1 - 7	31,4	13,9	20,1	83,9	93,0	9,8
8 - 14	30,6	13,4	19,8	81,9	76,0	16,9
15 - 21	32,4	13,6	22,0	65,4	23,6	11,6
22 - 28	31,7	16,4	22,2	82,2	65,8	-
29 - 35	30,9	15,5	22,0	77,1	48,3	-
36 - 42	32,5	15,9	22,5	75,4	2,3	-
43 - 49	31,2	18,7	23,6	77,7	2,3	-
50 - 56	32,5	18,7	24,5	69,9	15,8	-
57 - 63	29,6	18,3	22,2	88,7	61,2	-
64 - 70	28,1	18,9	21,9	92,0	90,2	-
Experimento 2						
Período	Temp. máxima (°C)	Temp. mínima (°C)	Temp. média (°C)	Umidade Relativa (%)	Precipitação (mm)	Umidade do solo (%)
0	26,6	15,4	20,6	55,3	0,0	18,0
1 - 7	28,1	13,6	21,0	54,0	0,0	15,5
8 - 14	28,2	8,0	16,8	53,9	0,3	19,0
15 - 21	28,9	13,6	21,7	43,0	0,0	17,8
22 - 28	28,5	13,5	19,8	62,2	0,0	18,1
29 - 35	29,1	11,5	17,9	72,4	70,9	23,2
36 - 42	23,0	7,0	15,4	88,9	23,6	20,8
43 - 49	26,9	7,7	16,2	68,2	0,0	19,4
50 - 56	28,9	13,4	20,1	62,8	6,4	17,4
57 - 63	30,0	9,0	19,0	68,8	16,5	16,4
64 - 70	31,3	9,9	18,0	68,4	6,1	18,4

Tabela 6 - Temperaturas máxima, média e mínima (°C), umidade relativa (%), precipitação (mm) e umidade do solo (%) ocorridas durante a condução dos experimentos de sobrevivência do isolado de sobrevivência do isolado 3098C de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera e rizosfera de plantas cultivadas (experimentos 3 e 4)

Experimento 3						
Período	Temp. máxima (°C)	Temp. mínima (°C)	Temp. média (°C)	Umidade Relativa (%)	Precipitação (mm)	Umidade do solo (%)
0	30,8	19,5	25,0	53,4	0,0	19,3
1 – 7	32,9	17,0	22,6	78,2	39,1	17,6
8 - 14	30,3	16,4	21,9	83,4	32,5	17,4
15 - 21	29,5	17,5	22,4	80,2	25,9	12,9
22 - 28	31,7	19,0	23,9	82,7	11,4	14,3
29 - 35	32,9	18,6	24,7	76,0	19,6	16,8
36 - 42	31,4	19,0	23,8	83,3	59,2	17,2
43 - 49	29,9	17,8	23,0	80,3	32,0	7,7
50 - 56	29,5	17,6	21,7	86,4	53,9	15,3
57 - 63	27,7	17,6	22,1	75,4	0,0	19,3
64 - 70	28,3	15,4	20,7	71,5	0,0	17,6
Experimento 4						
Período	Temp. máxima (°C)	Temp. mínima (°C)	Temp. média (°C)	Umidade Relativa (%)	Precipitação (mm)	Umidade do solo (%)
0	24,2	16,1	20,0	84,9	0,3	18,5
1 – 7	30,5	12,8	19,5	83,8	32,3	20,7
8 - 14	32,2	12,7	21,1	74,4	2,5	16,2
15 - 21	31,8	15,1	20,0	81,6	5,6	9,4
22 - 28	31,9	17,0	23,9	76,0	1,3	9,3
29 - 35	29,1	14,5	20,3	85,7	89,9	16,9
36 - 42	29,9	15,8	21,8	80,0	83,3	17,1
43 - 49	31,0	16,5	22,4	73,6	75,9	17,2
50 - 56	32,3	13,0	23,7	58,8	0,0	20,1
57 - 63	33,7	20,3	26,0	70,1	7,0	27,1
64 - 70	31,3	18,2	22,6	83,8	63,6	22,7

3.3.2 Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na rizosfera do repolho cultivado em seis tipos de solos

Baixa capacidade de sobrevivência de Xcc foi observada na rizosfera de repolho cultivada em seis tipos de solo (Tabela 7). O maior período máximo de sobrevivência ocorreu no solo 4 (36 dias), com valor de área abaixo da curva de sobrevivência (AACS) de 119. Nos solos 3 e 6 o período máximo de sobrevivência de Xcc foi de 28 dias, com valores máximos de AACS variando de 100 a 109. Para os demais solos, os períodos máximos de sobrevivência variaram entre 20 e 24 dias e os valores máximos de AACS entre 68 e 95.

Com relação a umidade, o solo 4 apresentou o menor valor de umidade média (12,6 %) e o solo 5 o maior valor (21,5 %). Para os demais tipos de solos a umidade média variou entre 13,1 % e 21,5% (Tabela 8).

Tabela 7 - Períodos de sobrevivência e área abaixo da curva de sobrevivência do isolado 3098C de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na rizosfera de repolho cultivado em diferentes tipos de solo nos quatro experimentos

Solo	Período de sobrevivência (dias)				
	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Intervalos
1	< 4 ¹ (9) ²	4 (24)	20 (68)	8 (31)	< 4 - 20 (9 - 68)
2	< 4 (8)	12 (36)	20 (71)	20 (60)	< 4 - 20 (8 - 71)
3	4 (21)	< 4 (11)	28 (109)	8 (30)	< 4 - 28 (11 - 109)
4	< 4 (9)	8 (30)	36 (119)	24 (66)	< 4 - 36 (9 - 119)
5	< 4 (10)	8 (36)	24 (95)	12 (37)	< 4 - 24 (10 - 95)
6	< 4 (8)	12 (47)	28 (100)	8 (29)	< 4 - 28 (8 - 100)

¹Período de sobrevivência (dias); ²Área abaixo da curva de sobrevivência (AACS) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Tabela 8 - Umidade dos seis solos para os períodos de sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na rizosfera de repolho nos quatro experimentos

Solo	Umidade do Solo (%)				
	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Média
1	10,0	14,8	17,1	10,5	13,1
2	17,5	14,8	13,4	20,8	16,6
3	16,4	22,0	19,9	21,3	19,9
4	15,1	9,2	12,1	14,0	12,6
5	19,9	22,2	19,4	24,6	21,5
6	17,9	17,6	16,2	21,9	18,4

3.3.3 Caracterização dos isolados bacterianos

Todos os isolados amostrados nos ensaios, juntamente com o isolado padrão de Xcc 3098C, submetidos à técnica de PCR, amplificaram uma banda de 519 pb que foram visualizadas no gel de agarose.

3.4 DISCUSSÃO

A rotação de culturas apresenta resultados satisfatórios para bactérias com gama de hospedeiros restrita e incapazes de sobreviver por longos períodos na ausência de um hospedeiro vivo (SUMNER, 1982; GOTO, 1992; KADO, 2010; BULL et al., 2016). Apesar dessa prática ser recomendada para o manejo de Xcc em áreas com histórico de podridão negra (SCHAAD; WHITE, 1974; VICENTE; HOLUB, 2013; SILVA JÚNIOR et al., 2020), os resultados aqui demonstram a importância da seleção de espécies utilizadas em rotação, e que uma preferência deve ser dada para espécies que não favoreçam a sobrevivência da bactéria no campo.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* sobreviveu por longos períodos na filosfera de repolho, tomate, trigo, abóbora, aveia preta, nabo forrageiro, pimentão, mostarda e feijão. Esse resultado já era esperado em repolho, nabo forrageiro e mostarda, uma vez que Xcc é adaptada para sobreviver na filosfera de plantas da família Brassicaceae (SCHAAD; DIANESE, 1981; ARIAS; NELSON; ALVAREZ, 2000). Essa capacidade de adaptação na filosfera, considerada para várias espécies de bactérias um ambiente hostil (BEATTIE; LINDOW, 1994; VORHOLT, 2012), pode ser explicada pela produção do pigmento xantomonadina por Xcc, que protege as células bacterianas do estresse fotooxidativo (POPLAWSKY; URBAN; CHUN, 2000), e de polissacarídeos extracelulares (EPS), que além dessa função, estão envolvidos na formação dos agregados (VICENTE; HOLUB, 2013).

Em plantas de algodão, soja, girassol e cenoura os períodos de sobrevivência de Xcc na filosfera foram menores comparado às espécies citadas anteriormente; entretanto, dependendo da condição ambiental, também podem favorecer a persistência do inóculo no campo. No Havaí, experimentos realizados em casa de vegetação demonstraram que Xcc sobreviveu por 48 dias na filosfera mostarda e alface (ARIAS; NELSON; ALVAREZ, 2000), não sendo, portanto, adequadas em rotação com brássicas. Por outro lado, com base neste trabalho e considerando apenas a sobrevivência da bactéria na filosfera, a alface poderia ser indicada em rotação, assim

como também o milho, sorgo, cebolinha, espinafre, abobrinha e crotalária, uma vez que Xcc apresentou baixa sobrevivência na filosfera dessas espécies.

Com relação à população de Xcc na filosfera das plantas cultivadas, representada pelos valores de AACS, o maior valor de AACS foi observado em repolho, demonstrando que a bactéria está mais adaptada à filosfera dessa espécie. Resultado semelhante foi observado em *X. axonopodis* pv. *allii* na filosfera da cebola, cuja população foi maior nessa cultura do que em feijão e lentilha, consideradas hospedeiras epifíticas da bactéria (GENT; LANG; SCHWARTZ, 2005). Aqui, espécies não hospedeiras apresentaram valores de AACS próximos ou maiores do que plantas de nabo forrageiro e mostarda, demonstrando que essas espécies podem fornecer condições para a sobrevivência do inóculo de Xcc semelhantes às oferecidas por espécies hospedeiras.

O comportamento de Xcc na filosfera das plantas avaliadas pode ter sido influenciado por vários fatores. As plantas moldam a estrutura das comunidades bacterianas presentes na filosfera (VORHOLT, 2012; SCHLECHTER; MIEBACH; REMUS-EMSERMANN, 2019), o que pode explicar as diferenças entre os períodos de sobrevivência de Xcc nas espécies aqui estudadas. Os fatores que determinam essa capacidade são poucos compreendidos, mas é provável que estejam relacionados aos componentes genéticos, que regulam a diversidade estrutural da superfície foliar e o sistema de defesa das plantas (VORHOLT, 2012; RASTOGI; COAKER; LEVEAU, 2013). As características foliares também podem variar entre cultivares e até folhas da mesma planta, e influenciar, portanto, a estrutura das populações bacterianas (STONE; WEINGARTEN; JACKSON, 2018). Microrganismos não patogênicos podem competir com as populações de fitobactérias por nutrientes e espaço e produzir compostos tóxicos, influenciando a estrutura das populações na filosfera (LINDOW; LEVEAU, 2002; VORHOLT, 2012; LEVEAU, 2018).

Os fatores climáticos podem também ter influenciado no comportamento das populações de Xcc na filosfera. De modo geral, temperaturas moderadas e alta umidade favorecem as populações epifíticas de bactérias (LEBEN, 1965; DANIEL; BOHER, 1985). Chuvas intensas e frequentes, entretanto, podem remover um grande número de células bacterianas das superfícies das folhas, depositá-las no solo e reduzir as populações na filosfera (HIRANO; UPPER, 2000), o que pode explicar a diferença entre os períodos de sobrevivência e os valores de AACS nos experimentos 1 e 3. Por outro lado, períodos secos com baixos volumes de chuvas e baixa umidade relativa

podem influenciar negativamente as populações epífitas (DANIEL; BOHER, 1985), como observado para algumas espécies no experimento 2 em relação ao 4. As flutuações de temperatura que ocorrem ao longo do dia podem afetar diretamente o crescimento das populações bacterianas e indiretamente podem causar a evaporação da água disponível na superfície da folha (LEVEAU, 2018). Também a radiação UV contribui para a seleção de populações adaptadas à filosfera, as radiações UV-A e UV-B são danosas às células bacterianas pois podem danificar o DNA ou contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio tóxicas (BEATTIE; LINDOW, 1995; LEVEAU, 2018).

A rizosfera é um ambiente mais favorável a sobrevivência de bactérias quando comparado a filosfera, pois fornece nutrientes em maior abundância e protege as células das drásticas variações climáticas (BRENCIC; WINANS, 2005). No entanto, demonstrou-se desfavorável à sobrevivência de *Xcc* neste trabalho, uma vez que a bactéria sobreviveu por curtos períodos na maioria das plantas avaliadas em comparação com o solo. A baixa capacidade de sobrevivência de *Xcc* no solo também foi verificada em experimentos realizados a campo no Brasil (SILVA JÚNIOR et al., 2020). Resultado não esperado ocorreu no repolho, pois a bactéria sobreviveu por um longo período na rizosfera dessa hospedeira. Maior valor de AACs também foi observado na rizosfera do repolho, provavelmente porque *Xcc* está mais adaptada a essa hospedeira do que nas demais espécies. Plantas de abóbora, alface, trigo, mostarda e feijão, apresentaram períodos máximos de sobrevivência e valores máximos de AACs inferiores ao repolho, mas de qualquer forma, não devem ser utilizadas em rotação, pois podem favorecer a permanência do inóculo em áreas de cultivo.

Diversos fatores podem explicar o comportamento de *Xcc* nas espécies aqui estudadas. As plantas liberam vários compostos orgânicos na região da rizosfera, cuja composição e quantidade pode variar de uma espécie para outra, servindo de substrato para o crescimento dos microrganismos (YANG; CROWLEY, 2000; BULGARELLI et al., 2015). Metabolitos específicos secretados por uma determinada espécie seleciona comunidades microbianas específicas na rizosfera, o que pode explicar os resultados aqui obtidos. Além da espécie, essas comunidades também são influenciadas pela variedade ou cultivar da espécie cultivada, e sofrem modificações durante os estádios fenológicos (MARK et al., 2005; PHILIPPOT et al., 2013; COMPANT et al., 2019). Por ser um ambiente rico em nutrientes, a rizosfera

abriga um grande número de microrganismos que competem pelos nutrientes secretados nas raízes das plantas (BAIS et al., 2006; BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012). O sucesso da bactéria sobreviver na rizosfera é então influenciada pela comunidade microbiana (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; SCHLATTER et al., 2017).

Apesar de Xcc se encontrar em um ambiente mais protegido quando comparado à filosfera, esta não está livre de sofrer as influências dos fatores ambientais. A umidade do solo é importante para a sobrevivência de Xcc, porém o excesso de água pode produzir um ambiente anaeróbico prejudicial à bactéria (ARIAS; NELSON; ALVAREZ, 2000), que pode ocorrer em razão da precipitação em excesso e frequente. As precipitações registradas durante a condução experimentos podem ter influenciado a sobrevivência de Xcc na rizosfera de algumas espécies. A influência da temperatura sobre Xcc no solo é conhecida. Em experimentos realizados sob condições controladas, o aumento da temperatura reduziu a sobrevivência da bactéria no solo (SILVA JÚNIOR et al., 2020). As flutuações de temperatura que ocorreram durante a condução experimentos podem também ter influenciado os resultados aqui obtidos.

As propriedades físico-químicas dos solos também podem influenciar o comportamento das populações microbianas na rizosfera (PHILIPPOT et al., 2013). Xcc apresentou baixa capacidade de sobrevivência na rizosfera de repolho cultivado em diferentes solos. O maior período de sobrevivência e valor de AACS ocorreu no solo 4 de textura arenosa e baixo teor de matéria orgânica. Resultado esse não esperado, pois solos arenosos são menos favoráveis à sobrevivência da bactéria (SILVA JÚNIOR et al., 2020), como ocorreu no solo 1. Para os demais solos de textura mista e argilosa, com maiores teores de matéria orgânica, a sobrevivência da bactéria foi menor. A matéria orgânica, influencia de forma positiva ou negativa as populações no solo, pois interfere na disponibilidade de nutrientes e favorece microrganismos antagonistas (MENZIES, 1963). Com relação ao pH, quanto mais próximo da neutralidade mais favorável para Xcc (SANTIRANJAN; CHATTOPADHYAY; BANDYOPADHYAY, 1986), o que, de modo geral, pode explicar a baixa sobrevivência da bactéria nos diferentes solos. Nenhuma relação foi verificada entre em valores de umidade e a sobrevivência na rizosfera.

Os resultados aqui obtidos poderão ser utilizados para o manejo da podridão negra no Brasil, e nos demais países produtores de brássicas com condições climáticas semelhantes, uma vez que as informações na literatura são limitadas. Xcc

pode sobreviver em sementes, restos de culturas, plantas daninhas, e possui uma ampla gama de plantas hospedeiras. Apesar dessas características, a podridão negra pode ser eficientemente manejada em campos de brássicas através da rotação de culturas em combinação com outras práticas de controle. Neste estudo, abobrinha, cebolinha, crotalária, espinafre, milho e sorgo, não foram favoráveis a sobrevivência de Xcc na filosfera e rizosfera, e são recomendadas em rotação com cultivos de brássicas no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ARIAS, R. S.; NELSON, S. C.; ALVAREZ, A. M. Effect of soil–matric potential and phylloplanes of rotation-crops on the survival of a bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 2, p. 109-116, 2000.
- BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Epiphytic fitness of phytopathogenic bacteria: physiological adaptations for growth and survival. *In*: DANGL, J. L. (ed.). **Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals**. Berlin: Springer, 1994. cap. 1, p. 1-27.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 145-172, 1995.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.
- BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 69, n. 1, p. 155–194, 2005.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 392-403, 2015.
- BULL, C. T. et al. Plant pathogenic prokaryotes. *In*: OWNLEY, B. H.; TRIGIANO, R. N. (ed.). **Plant pathology: concepts and laboratory exercises**. 3. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2016. cap. 5, p. 81-101.
- COMPANT, S. et al. A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, Amsterdam, v. 19, p. 29-37, 2019.
- CURL, E. A. Control of plant diseases by crop rotation. **The botanical review**, New York, v. 29, n. 4, p. 413- 479, 1963.
- DANE, F.; SHAW, J. J. Survival and persistence of bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on host and non-host plants in the field environment. **Journal of Applied Bacteriology**, Chichester, v. 80, n. 1, p. 73-80, 1996.
- DANIEL, J. F; BOHER, B. Epiphytic phase of *Xanthomonas campestris* pathovar manihotis on aerial parts of cassava. **Agronomie**, Paris, v. 5, n. 2, p. 111-116, 1985.
- DURY, J. et al. Models to support cropping plan and crop rotation decisions. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 32, n. 2, p. 567-580, 2012.

GENT, D. H.; LANG, J. M.; SCHWARTZ, H. F. Epiphytic Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 6, p. 558-564, 2005.

GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1992.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 21, n. 1, p. 243-269, 1983.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 624-653, 2000.

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

KARLEN, D. L. et al. Crop Rotations for the 21st Century. **Advances in Agronomy**, Maryland Heights, v. 53, p. 1-45, 1994.

LEBEN, C. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 3, n. 1, p. 209-230, 1965.

LEVEAU, J. H. J. Microbial communities in the phyllosphere. In: ROBERTS, J. A. (ed.). **Annual Plant Reviews book series**. Chichester: John Wiley & Sons, 2018. cap. 11, p. 334-367.

LINDOW, S. E.; LEVEAU, J. H. J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 238-243, 2002.

MARINGONI, A. C.; SILVA JÚNIOR, T. A. F. Doenças das Brássicas. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, cap. 19, p. 165-173.

MARK, G. L. et al. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 48, p. 17454-17459, 2005.

MENZIES, J. D. Survival of microbial plant pathogens in soil. **The Botanical Review**, New York, v. 29, n. 1, p. 79-122, 1963.

NEGASH, F.; MULUALEM, T.; FIKIRIE, K. Effect of cropping sequence on agricultural crops: implications for productivity and utilization of natural resources. **Advances in Crop Science and Technology**, Henderson, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2018.

PALTI, J. **Cultural practices and infectious crop diseases**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 2012.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, New York v. 11 p. 789-799, 2013.

POPLAWSKY, A. R.; URBAN, S. C.; CHUN, W. Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5123-5127, 2000.

RASTOGI, G.; COAKER, G. L.; LEVEAU, J. H. J. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 348, n. 1, p. 1-10, 2013.

SANTIRANJAN, B.; CHATTOPADHYAY, S. B.; BANDYOPADHYAY, S. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in soil. **Indian Journal of Mycological Research**, Calcutta, v. 24, n. 2, p. 97-111, 1986.

SCHAAD, N. W.; DIANESE, J. C. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 11, p. 1215-1220, 1981.

SCHAAD, N. W.; THAVEECHAI, N. Black Rot of Crucifers in Thailand. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 1231-1234, 1983.

SCHAAD, N. W.; WHITE, W. C. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, n. 12, p. 1518-1520, 1974.

SCHLATTER, D. et al. Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, n. 11, p. 1284-1297, 2017.

SCHLECHTER, R. O.; MIEBACH, M.; REMUS-EMSERMANN, M. N. P. Driving factors of epiphytic bacterial communities: a review. **Journal of Advanced Research**, Amsterdam, v. 19, p. 57-65, 2019.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 199-221, 1974.

SILVA, J. C. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of weeds. **Plant Pathology**, Chichester, v. 66, n. 9, p. 1517-1526, 2017.

SILVA JÚNIOR, T. A. F. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 156, n. 2, p. 399-411, 2020.

STONE, B. W. G.; WEINGARTEN, E. A.; JACKSON, C. R. The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. **Annual Plant Reviews**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 533-556, 2018.

SUMNER, D. R. Crop rotation and plant productivity. In: RECHCIGL, M. (ed.). **Handbook of Agricultural Productivity**. Boca Raton: Taylor & Francis, 1982. v. 1, p. 273-313.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; GAMLIEL, A.; FINCKH, M. R. Plant disease management in organic farming systems. **Pest Management Science**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 30-44, 2016.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 12, p. 828-840, 2012.

WEZEL, A. et al. Agroecological practices for sustainable agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2014.

YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 345-351, 2000.

ZACCARDELLI, M. et al. Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene *hrcC*. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 118, n. 3, p. 299-306, 2007.

ZEGADA-LIZARAZU, W.; MONTI, A. Energy crops in rotation: a review. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 12-25, 2011.

CAPÍTULO 4 - DISSEMINAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* PV. *campestris* POR INSETOS

João César da Silva, Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior, José Marcelo Soman, Luís Fernando Maranhão Watanabe, Renate Krause Sakate, Antonio Carlos Maringoni

RESUMO

Este trabalho avaliou a disseminação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) por *Bemisia tabaci* e *Myzus persicae*, importantes pragas em cultivos de brássicas. Para avaliar a aderência de Xcc no corpo dos insetos, foram instalados três experimentos em B.O.D. Dois experimentos realizados em épocas diferentes, avaliaram a aderência da bactéria nos insetos expostos a discos de couve inoculados com Xcc, por 94 h, e as avaliações realizadas a cada 24 h. Em outro experimento, foi avaliada a aderência de Xcc nos insetos expostos as plantas de couve inoculadas, conduzido por 15 dias, e as avaliações realizadas a cada 7 dias. A disseminação da bactéria pelos insetos também foi avaliada em experimentos sob condições casa de vegetação, com e sem chance de escolha. Os experimentos foram conduzidos por 15 dias, e avaliada a aderência de Xcc nos insetos a cada 7 dias. Xcc foi recuperada de *B. tabaci* e *M. persicae* dos discos de couve por até 48 h. Em plantas de couve a bactéria foi recuperada de *M. persicae* aos 7 dias, mas não de *B. tabaci*. Em casa de vegetação, os insetos não disseminaram Xcc de plantas de couve sintomáticas para plantas sadias. Populações de Xcc não foram recuperadas dos insetos nos experimentos de disseminação. Os resultados demonstraram que aparentemente *B. tabaci* e *M. persicae* não estão envolvidos na disseminação de Xcc.

Palavras-chave: Bactéria. Mosca-branca, Pulgão. Aderência.

ABSTRACT

This study evaluated the dissemination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) by *Bemisia tabaci* and *Myzus persicae*, important pests in brassica crops. To assess Xcc adherence to the insect's body, three experiments were installed in B.O.D. Two experiments carried out at different times evaluated the bacterium adherence to insects exposed to cabbage discs inoculated with Xcc, for 94h, and the evaluations were carried out every 24h. In another experiment, Xcc adherence to insects exposed to inoculated cabbage plants was evaluated, conducted for 15 days, and evaluations were performed every 7 days. The bacterium dissemination by insects was also evaluated in experiments under greenhouse conditions, with and without a choice. The experiments were conducted for 15 days, and Xcc adherence to insects was evaluated every 7 days. Xcc was recovered from *B. tabaci* and *M. persicae* from cabbage discs for up to 48h. In cabbage plants, the bacterium was recovered from *M. persicae* at 7 days, but not from *B. tabaci*. In the greenhouse, the insects did not spread Xcc from symptomatic kale plants to healthy ones. Xcc populations were not recovered from insects in the dissemination experiments. The results showed that apparently *B. tabaci* and *M. persicae* are not involved in Xcc dissemination.

Keywords: Bacterium. Whitefly. Aphid. Adhesion.

4.1 INTRODUÇÃO

A podridão negra, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Downson (Xcc) está presente em todos os países onde há cultivo de brássicas e é considerada um problema em regiões quentes e úmidas. (WILLIAMS, 2007; LEMA et al., 2012). A doença ocorre em variedades de *Brassica oleracea*, rabanete, ornamentais, plantas daninhas e *Arabidopsis thaliana*. Os sintomas comumente observados incluem amarelecimento nas margens das folhas seguido de necrose e escurecimento do tecido vascular (VICENTE; HOLUB, 2013; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). Danos causados pelo patógeno em cultivares suscetíveis pode causar a morte das plantas e consequentemente grandes perdas econômicas (LEMA et al., 2012).

Para o manejo eficiente da podridão negra em áreas com cultivo de brássicas é importante conhecer as estratégias de sobrevivência e os mecanismos de disseminação da bactéria (BROWN, 1997; WILLIAMS, 2007; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). É de conhecimento que Xcc sobrevive durante a ausência da cultura em sementes, solo, restos culturais e plantas daninhas (SCHAAD; DIANESE, 1981; VICENTE; HOLUB, 2013; SILVA JÚNIOR et al., 2020), e é disseminada eficientemente por sementes e respingos de água da chuva ou irrigação (KOCKS; ZADOKS; RUISSSEN, 1999; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). Entretanto, a disseminação da bactéria por insetos é pouco conhecida e estudada.

Os insetos são importantes agentes de disseminação de fitopatógenos (AGRIOS, 2005; AMORIM; PASCHOLATI, 2018). As bactérias são disseminadas de plantas doentes para plantas saudáveis de forma acidental quando aderem externamente ao corpo dos insetos ou através de interações específicas com inseto, envolvendo um período de aquisição e latência para que a transmissão ocorra (BEDENDO; BELASQUE, 2018). Além dos insetos estarem envolvidos na disseminação do inóculo primário e secundário no campo, também podem provocar ferimentos nos tecidos das plantas durante a alimentação e favorecer a penetração de bactérias (ZANDJANAKOU-TACHIN et al., 2007).

Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos em que foi investigada a capacidade de disseminação de Xcc por insetos. Em um estudo realizado nos EUA, foi demonstrado que o besouro *Phyllotreta cruciferae* (Coleoptera: Chrysomelidae), praga importante das brássicas no país, possui limitado potencial para atuar como agente de disseminação de Xcc (SHELTON; HUNTER, 1985). Na Holanda, moscas

de *Calliphora vomitoria* (Diptera: Calliphoridae) inoculadas com a bactéria e mantidas em gaiolas com plantas de couve-flor em floração disseminaram o patógeno e foram responsáveis por lotes de sementes contaminados com a bactéria (VAN DER WOLF; VAN DER ZOUWEN, 2010).

No Brasil, vários insetos são descritos como pragas em cultivo de brássicas, como a mosca branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) e o pulgão *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), porém não há informações sobre a importância desses insetos na disseminação de Xcc no país (HOLTZ et al., 2015). Dentro desse contexto, este trabalho avaliou o potencial de *B. tabaci* e *M. persicae* na disseminação de Xcc.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (UNESP), Botucatu, São Paulo.

4.2.2 Isolado bacteriano e condições de cultivo e preservação

Nos experimentos foi empregado o isolado 3098C de Xcc, resistente a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina, e patogênico a plantas de brássicas, que foi cultivado previamente em nutriente sacarose ágar acrescido de rifampicina - NSAR [20 g.L⁻¹ de nutriente ágar (Merck, Alemanha), 5 g.L⁻¹ de sacarose (Synth, Brasil) e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina (Rifaldin)] e incubado a 28 °C por 48 h. O isolado foi e preservado em glicerol 30 % (v/v) e mantido à - 80 °C.

4.2.3 Obtenção e manutenção das populações dos insetos

Foram utilizadas populações de *B. tabaci* e de *M. persicae*, obtidas de criações do Departamento de Proteção Vegetal. As criações foram mantidas em plantas saudáveis de couve manteiga (cv. Geórgia) cultivadas em casa de vegetação (temperatura 22 – 28 °C e umidade relativa 60 – 90 %).

4.2.4 Confirmação da ausência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nos insetos

Empregou-se o protocolo adaptado de Van Der Wolf e Van Der Zouwen (2010), na qual 100 insetos de cada espécie foram coletados, distribuídos em tubos de microcentrífuga (10 insetos de cada espécie por tubo) contendo 300 µL de tampão fosfato-salina (PBS) 10 mM (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,9 g Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄, 1 L de água destilada autoclavada) pH 7,2, posteriormente triturados, agitados (200 rpm/ 1 min.) e 100 µL plaqueados em NSA. As placas foram incubadas (28 °C/ 48 h) e a presença de colônias de Xcc analisada. Após a incubação, não foi observada a presença de Xcc em NSA, confirmando a ausência da bactéria nos insetos.

4.2.5 Obtenção das plantas de couve

Sementes de couve manteiga (cv. Geórgia) foram previamente semeadas em bandeja de Isopor® contendo substrato organo-mineral (Tropstrato HT; Mogi Mirim). Posteriormente as plântulas foram transplantadas para vasos de 2L contendo substrato (composição: terra de barranco, areia grossa e substrato organo-mineral na proporção 1:1:1, suplementado com 0,6 kg de sulfato de amônio, 1,7 kg de superfosfato simples, 0,6 kg de cloreto de potássio e 0,8 kg de calcário dolomítico para cada m³ da mistura) e mantidas em casa de vegetação (temperatura 22 – 28 °C e umidade relativa 60 – 90 %). Por volta de 25 dias do transplante, as plantas foram utilizadas nos experimentos.

4.2.6 Aderência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em *Bemisia tabaci* e *Myzus persicae*

4.2.6.1 Exposição dos insetos a discos de couve inoculados com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Dois experimentos (denominados experimentos 1 e 2) foram realizados em épocas diferentes para avaliar a capacidade de Xcc em aderir ao corpo de *B. tabaci* e *M. persicae*, via exposição dos insetos a discos de couve inoculados com Xcc.

Em cada experimento, foram utilizados 128 discos de couve com 38 mm², obtidos com vazador de rolhas de 22 mm de diâmetro, sendo 64 discos submetidos a imersão em suspensão bacteriana 10⁸ UFC mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,1) do isolado 3098C de Xcc, e 64 discos a imersão em água destilada, por 5 minutos. Após remoção do

excesso de água e inóculo, os discos foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo folhas de papel filtro umedecidos (4 discos por placa), e mantidos em B.O.D (26 °C e fotoperíodo de 12 h) por 24 h. A transferência dos insetos (20 insetos por placa) foi realizada com um aspirador manual, por meio de um orifício circular realizado na tampa das placas de Petri, posteriormente vedado com Parafilm M®. As placas foram mantidas por 96 h em B.O.D e as avaliações realizadas a cada 24 h, recuperando-se a bactéria aderida aos insetos.

Os experimentos constituíram em 4 tratamentos (tratamento 1, exposição de *B. tabaci* a discos imersos em solução contendo Xcc; tratamento 2, exposição de *M. persicae* a discos imersos em solução contendo Xcc; tratamento 3, exposição de *B. tabaci* a discos imersos em água destilada; tratamento 4, exposição de *M. persicae* a discos imersos em água destilada) e 8 repetições.

4.2.6.2 Exposição dos insetos a plantas de couve inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Para este experimento (experimento 3), plantas de couve com quatro folhas expandidas foram inoculadas com suspensão bacteriana 10^8 UFC.mL⁻¹ do isolado 3098C de Xcc e mantidas em B.O.D (26 °C e fotoperíodo de 12 h). As plantas foram protegidas por gaiolas individuais e os insetos transferidos (60 insetos de cada espécie por planta), 24 h após inoculação, com auxílio de aspirador manual. As plantas foram mantidas em B.O.D por 15 dias e as avaliações realizadas a cada 7 dias, recuperando-se Xcc aderida aos insetos.

O experimento foi constituído de 4 tratamentos (tratamento 1, exposição de *B. tabaci* a plantas inoculadas com Xcc; tratamento 2, exposição de *M. persicae* a plantas inoculadas com Xcc; tratamento 3, exposição de *B. tabaci* a plantas não inoculadas; tratamento 4, exposição de *M. persicae* a plantas não inoculadas) e 8 repetições.

4.2.7 Disseminação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* por *Bemisia tabaci* e *Myzus persicae*

Três experimentos (denominados experimentos 4, 5 e 6) foram realizados em casa de vegetação para avaliar a disseminação de Xcc por *B. tabaci* e *M. persicae*. Plantas de couve com sintomas de podridão negra foram obtidas a partir de pequenas incisões com tesoura nas margens das folhas, seguido de inoculação por pulverização

de suspensão bacteriana 10^8 UFC.mL⁻¹ do isolado 3098C de Xcc, até o ponto de escorrimento.

Nos experimentos 4 e 5, sem chance de escolha, 1200 insetos de cada espécie, foram expostos às plantas infectadas por Xcc e expressando sintomas da doença por 48 h; posteriormente, os insetos foram transferidos para gaiolas com tela antiafídeos (1,0 m de comprimento, por 0,80 m de largura e 1,0 m de altura) contendo plantas sadias de couve, sendo mantidos por 15 dias nessas plantas. No experimento 6, com chance de escolha, 600 insetos de cada espécie foram expostos às plantas sintomáticas e sadias numa mesma gaiola, e mantidos por 15 dias para verificar a disseminação de Xcc. As avaliações consistiram na observação de sintomas nas plantas e na recuperação de Xcc aderida aos insetos a cada 7 dias.

4.2.8 Determinação da população de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera

Para recuperar Xcc da superfície dos discos de folhas nos experimentos 1 e 2, foram selecionados ao acaso quatro discos dos tratamentos 1 e 2 (dois discos por tratamento) e quatro discos dos tratamentos 3 e 4 (dois discos por tratamento). Os discos foram distribuídos individualmente em tubos Falcon contendo 15 mL de PBS, agitados (200 rpm/ 10 min), diluídos em série (10^0 a 10^{-4}) e 100 µL plaqueados em triplicata no meio NSAR, acrescido de 50 µg.mL⁻¹ de clorotalonil e 50 µg.mL⁻¹ de tiofanato metílico (NSARF). As placas foram incubadas (28 °C/ 72 h), a presença de Xcc avaliada e os dados transformados em ufc/cm² de tecido.

Para a recuperação de Xcc nos experimentos 3, 4, 5 e 6, inicialmente folhas de couve foram selecionadas ao acaso de algumas plantas, em cada tratamento, e destacadas do caule. Posteriormente, quatro discos de 38 mm² foram obtidos com vazador de rolhas de 22 mm e submetidos a recuperação de Xcc como descrito anteriormente.

4.2.9 Processamento de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de *Bemisia tabaci* e *Myzus persicae*

Para todos os experimentos, populações de *B. tabaci* e *M. persicae* foram coletadas e distribuídas em tubos de microcentrifuga (2 mL) contendo 300 µL de PBS. Foram depositados 10 indivíduos por tubo para *B. tabaci* (total de 30 insetos) e 5 indivíduos para *M. persicae* (total de 15 insetos), seguido de trituração e agitação (200

rpm/ 1 min). O plaqueamento foi realizado em triplicata em meio NSARF. As placas foram incubadas (28 °C por 72 h), a presença de Xcc confirmada e os dados transformados em ufc/inseto.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 População de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera

As populações médias de Xcc variaram na filosfera da couve durante os períodos de avaliação. Nos experimentos com discos mantidos em B.O.D, as populações médias de Xcc variaram de $4,1 \times 10^5$ ufc/cm² de tecido para $1,1 \times 10^7$ ufc/cm² de tecido no experimento 1, e de $1,6 \times 10^5$ ufc/cm² de tecido para $3,3 \times 10^8$ ufc/cm² no experimento 2. Populações de Xcc não foram recuperadas dos discos imersos e água destilada (Tabela 1).

Nos experimentos com plantas de couve, as populações médias variaram de $1,0 \times 10^4$ ufc/cm² de tecido para $6,7 \times 10^4$ ufc/cm² de tecido no experimento 3; de $1,5 \times 10^3$ ufc/cm² de tecido para $9,5 \times 10^5$ ufc/cm² de tecido no experimento 4; de $1,9 \times 10^4$ ufc/cm² de tecido para $8,3 \times 10^2$ ufc/cm² de tecido no experimento 5; e de $9,5 \times 10^4$ ufc/cm² de tecido para $3,7 \times 10^5$ ufc/cm² de tecido no experimento 6 (Tabela 2). Populações de Xcc não foram recuperadas de plantas não inoculadas.

Tabela 1 - População média de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera dos discos em B.O.D

Experimentos	Tratamentos	Períodos de avaliações				
		0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1	1 - 2	$4,1 \times 10^5$	$8,8 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7$	$9,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$
	3 - 4	NR	NR	NR	NR	NR
2	1 - 2	$1,6 \times 10^5$	$3,7 \times 10^6$	$6,6 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$3,3 \times 10^8$
	3 - 4	NR	NR	NR	NR	NR

*População em ufc/cm² de tecido; NR = população não recuperada.

Tabela 2 - População média de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na filosfera de plantas de couve mantidas em B.O.D e casa de vegetação

Experimentos	Tratamentos	Períodos de avaliações		
		0 dias	7 dias	14 dias
3	Plantas inoculadas	$1,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$	$6,7 \times 10^4$
	Plantas não inoculadas	NR	NR	NR
4	Plantas com sintomas	$1,5 \times 10^3$	$9,9 \times 10^4$	$9,5 \times 10^5$
	Plantas não inoculadas	NR	NR	NR
5	Plantas com sintomas	$1,9 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$8,3 \times 10^2$
	Plantas não inoculadas	NR	NR	NR
6	Plantas com sintomas	$9,5 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4$	$3,7 \times 10^5$
	Plantas não inoculadas	NR	NR	NR

*População em ufc/cm² de tecido; NR = população não recuperada.

4.3.2 Aderência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nos insetos

Xanthomonas campestris pv. *campestris* foi recuperada por até 48 horas de *B. tabaci* e *M. persicae* expostos a discos de couve imersos em solução contendo a bactéria nos experimentos 1 e 2 (Tabela 3). Após esse período, as populações de ambos insetos morreram e as avaliações não foram mais realizadas. Xcc não foi recuperada dos insetos quando expostos a discos de couve imersos em água destilada (Tabela 3).

No experimento 3, Xcc foi recuperada de *M. persicae* (população média de 2 ufc/inseto) 7 dias após a liberação dos insetos em plantas de couve inoculadas, porém não foi recuperada aos 15 dias. A bactéria não foi recuperada de *B. tabaci* durante as avaliações. Xcc também não foi recuperada de *B. tabaci* e *M. persicae* quando expostos a plantas não inoculadas.

Tabela 3 - População média de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* aderida *Bemisia tabaci* e *Myzus persicae*

Experimentos	Tratamentos	Períodos de avaliações	
		24 horas	48 horas
1	1 - <i>Bemisia tabaci</i> exposta a discos com Xcc	$7,7 \times 10^0$	$2,7 \times 10^1$
	2 - <i>Myzus persicae</i> exposto a discos com Xcc	$4,2 \times 10^4$	$8,0 \times 10^2$
	3 - <i>Bemisia tabaci</i> exposta a discos sem Xcc	NR	NR
	4 - <i>Myzus persicae</i> exposto a discos sem Xcc	NR	NR
2	1 - <i>Bemisia tabaci</i> exposta a discos com Xcc	$4,3 \times 10^2$	$9,9 \times 10^2$
	2 - <i>Myzus persicae</i> exposto a discos com Xcc	$3,3 \times 10^2$	$1,2 \times 10^5$
	3 - <i>Bemisia tabaci</i> exposta discos sem Xcc	NR	NR
	4 - <i>Myzus persicae</i> exposto a discos sem Xcc	NR	NR

*População em ufc/inseto; NR = população não recuperada.

4.3.3 Disseminação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* por *Bemisia tabaci* e *Myzus persicae* em plantas couve

Bemisia tabaci e *M. persicae* não foram capazes de disseminar Xcc de plantas doentes de couve para plantas saudáveis nos experimentos 4, 5 e 6. Populações de Xcc não foram recuperadas dos insetos amostrados nesses experimentos.

4.4 DISCUSSÃO

Os insetos possuem importante papel na epidemiologia de doenças, pois atuam como agentes de disseminação do inoculo primário e secundário dos patógenos no campo (AGRIOS, 2005; AMORIM; PASCHOLATI, 2018). Entretanto, para vários patossistemas o papel dos insetos na disseminação é pouco conhecido e estudado, o que pode impactar as estratégias de controle utilizadas no manejo de doenças

(BROWN, 1997; AGRIOS, 2005). Para Xcc, os resultados aqui obtidos demonstram que *B. tabaci* e *M. persicae* podem não estar envolvidos na disseminação de Xcc, considerando as condições em que os experimentos foram conduzidos.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* é adaptada à sobrevivência na filosfera de plantas hospedeiras (ARIAS; NELSON; ALVAREZ, 2000), o que explica o comportamento das populações na superfície dos discos de folhas mantidos em B.O.D e na filosfera de plantas de couve inoculadas. A bactéria foi recuperada de *B. tabaci* e *M. persicae* expostos a discos de couve durante os experimentos. A localização de Xcc no corpo dos insetos, entretanto, não foi investigada, mas supõe-se que estivessem aderidas externamente ao corpo. Para a bactéria ser encontrada nos tecidos internos de *B. tabaci* e *M. persicae*, seria necessário que Xcc fosse adquirida pelos insetos durante alimentação nos vasos de floema, processo esse pouco provável, já que Xcc estava presente em alta população na superfície dos discos. As populações bacterianas podem aderir a diferentes órgãos dos insetos. Por exemplo, *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. axonopodis* pv. *vignicola* foram encontradas em pernas e mandíbulas de *Zonocerus variegatus* (ZANDJANAKOU-TACHIN et al., 2007). *Erwinia amylovora* estava presente nas antenas, pernas e probóscide de *Aphis pomi* (HILDEBRAND; DICKLER; GEIDER, 2000).

Apesar de ser recuperada dos insetos quando mantidos nos discos de folha, populações de Xcc não foram recuperadas de *B. tabaci* expostas a plantas de couve mantidas em B.O.D. Em *M. persicae*, baixa população de Xcc foi recuperada após 7 dias e não foi mais recuperada dos insetos após 15 dias. Esses resultados demonstram que a bactéria possui uma capacidade de sobrevivência limitada nos insetos, mesmo quando mantidos em contato direto com a planta inoculada. As populações de Xcc podem variar na superfície da folha em função da disponibilidade de nutrientes, água e atuação da microflora antagonista. Essas populações não são encontradas uniformemente distribuídas na superfície das folhas, mas sim em pequenos agregados ou biofilmes localizados em depressões formadas nas junções das células epidérmicas, ao longo das nervuras e nas bases dos tricomas (VORHOLT, 2012; SCHLECHTER; MIEBACH; REMUS-EMSERMANN, 2019). Dessa maneira, dependendo da localização das populações no tecido vegetal, os insetos podem não entrar em contato com a bactéria. Nos experimentos com discos de couve, entretanto, esse fenômeno pode não ter ocorrido, em função do tamanho do tecido e da população de Xcc.

A disseminação de Xcc por *B. tabaci* e *M. persicae* não ocorreu de plantas com sintomas de podridão negra para plantas saudáveis nos experimentos em casa de vegetação e a bactéria também não foi recuperada dos insetos coletados das gaiolas durante a condução dos experimentos. Esses resultados demonstraram que esses insetos podem não ser capazes de disseminar Xcc entre plantas de brássicas. O besouro *Phyllotreta cruciferae* não foi considerado um vetor eficiente de Xcc, pois não foi capaz de adquirir prontamente a bactéria durante a alimentação das folhas. Além disso, as condições ambientais podem ter contribuído para a má aquisição da bactéria pelos insetos (SHELTON; HUNTER, 1985). A mosca polinizadora *Calliphora vomitoria* por outro lado, demonstrou-se eficiente na disseminação de Xcc. Apesar da bactéria ter sobrevivido por apenas 5 dias no corpo do inseto, Xcc foi eficientemente transmitida para as sementes, após moscas contaminadas serem mantidas com as plantas no período da floração (VAN DER WOLF; VAN DER ZOUWEN, 2010).

Vários fatores podem influenciar a capacidade de disseminação de bactérias por insetos (NADARASAH; STAVRINIDES, 2011; SUGIO et al., 2014). Os fatores ambientais exercem grande influência nesse processo. A exposição à radiação UV pode causar danos às células bacterianas, e reduzir a capacidade de disseminação das bactérias fitopatogênicas pelos insetos (ZANDJANAKOU-TACHIN et al., 2007; LEVEAU, 2018). Além dos fatores climáticos, o corpo do inseto e seus mecanismos de defesa podem impedir a aderência de bactérias, assim como interferir na sobrevivência e disseminação (NADARASAH; STAVRINIDES, 2011). Insetos membros da ordem Hemiptera como *B. tabaci* e *M. persicae* se destacam por produzirem grandes quantidades de ceras na forma de partículas, que recobrem seus corpos e atuam como uma barreira hidrofóbica, protegendo-os das variações do ambiente e do ataque de patógenos (BYRNE; HADLEY, 1988; BUCKNER; NELSON; MARDAUS, 1994). Essa característica pode explicar a baixa capacidade de aderência de Xcc nesses insetos nos experimentos, principalmente em *B. tabaci*.

A presença de microrganismos antagonistas pode contribuir para redução das populações bacterianas fitopatogênicas nos insetos. A baixa capacidade de sobrevivência em *Calliphora vomitoria* pode ser explicada pela presença de outras bactérias antagonistas a Xcc (VAN DER WOLF; VAN DER ZOUWEN, 2010). A comunidade endossimbionte também pode influenciar em vários aspectos a ecologia, comportamento e fisiologia dos insetos, incluindo respostas às mudanças climáticas, e proteção contra inimigos naturais, parasitas e patógenos, e também podem interferir

na disseminação de fitopatógenos. Além desses fatores, o custo adaptativo para a bactéria se associar a diferentes hospedeiros, pode influenciar na sobrevivência e disseminação. Bactérias disseminadas por insetos foram comprovadas ter significativa redução da virulência em plantas (NADARASAH; STAVRINIDES, 2011; SUGIO et al., 2014).

No Brasil, *B. tabaci* e *M. persicae* são importantes pragas das culturas e estão envolvidos na disseminação de várias espécies de fitopatógenos. Entretanto, neste trabalho, não foram capazes de disseminar Xcc de plantas com sintomas de podridão negra para plantas sadias e, portanto, podem não estar envolvidos na disseminação da bactéria.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, cap. 4, p. 45-70.
- ARIAS, R. S.; NELSON, S. C.; ALVAREZ, A. M. Effect of soil–matric potential and phylloplanes of rotation-crops on the survival of a bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 2, p. 109-116, 2000.
- BEDENDO, I. P.; BELASQUE, J. Bactérias Fitopatogênicas. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, cap. 9, p. 143-160.
- BROWN, J. F. Survival and dispersal of plant parasites: general concepts. *In*: BROWN, J. F.; OGLE, H. J. (ed.). **Plant Pathogens and Plant Diseases**. Armidale: Rockvale Publications, 1997. cap. 12, p. 195-206.
- BUCKNER, J. S.; NELSON, D. R.; MARDAS, M. C. The lipid composition of the wax particles from adult whiteflies, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 977-987, 1994.
- BYRNE, D. N.; HADLEY, N. F. Particulate surface waxes of whiteflies: morphology, composition and waxing behaviour. **Physiological Entomology**, Chichester, v. 13, n. 3, p. 267-276, 1988.
- HILDEBRAND, M.; DICKLER, E.; GEIDER, K. Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in a fire blight orchard. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 4, p. 251-256, 2000.
- HOLTZ, A. M. et al. **Pragas das brássicas**. 1. ed. Colatina: IFES, 2015.
- KOCKS, C. G.; ZADOKS, J. C.; RUISSSEN, M. A. Spatio-temporal development of black rot (*X. campestris* pv. *campestris*) in cabbage in relation to initial inoculum levels in field plots in The Netherlands. **Plant Pathology**, Chichester, v. 48, n. 2, p. 176-188, 1999.
- LEMA, M. et al. Screening for resistance to black rot in *Brassica oleracea* crops. **Plant breeding**, Berlin, v. 131, n. 5, p. 607-613, 2012.
- LEVEAU, J. H. J. Microbial communities in the phyllosphere. *In*: ROBERTS, J. A. (ed.). **Annual Plant Reviews book series**. Chichester: John Wiley & Sons, 2018. cap. 11, p. 334-367.

MARINGONI, A. C.; SILVA JÚNIOR, T. A. F. Doenças das Brássicas. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, cap. 19, p. 165-173.

NADARASAH, G.; STAVRINIDES, J. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 555-575, 2011.

SCHAAD, N. W.; DIANESE, J. C. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 11, p. 1215-1220, 1981.

SCHLECHTER, R. O.; MIEBACH, M.; REMUS-EMSERMANN, M. N. P. Driving factors of epiphytic bacterial communities: a review. **Journal of Advanced Research**, Amsterdam, v. 19, p. 57-65, 2019.

SHELTON, A. M.; HUNTER, J. E. Evaluation of the potential of the flea beetle *Phyllotreta cruciferae* to transmit *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causal agent of black rot of crucifers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, New York, v. 7, n. 3, p. 308-310, 1985.

SILVA JÚNIOR, T. A. F. S. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 156, n. 2, p. 399-411, 2020.

SUGIO, A. et al. Plant–insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 467-478, 2014.

VAN DER WOLF, J. M.; VAN DER ZOUWEN, P. S. Colonization of cauliflower blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via flies (*Calliphora vomitoria*) can result in seed infestation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 11-12, p. 726-732, 2010.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 12, p. 828-840, 2012.

WILLIAMS, P. H. Infectious Diseases. In: RIMMER, S. R.; SHATTUCK, V. I.; BUCHWALDT, L. (eds.). **Compendium of brassica diseases**. Saint Paul: APS Press, 2007. p. 60-62.

ZANDJANAKOU-TACHIN, M. et al. Detection, survival and transmission of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and *X. axonopodis* pv. *vignicola*, causal agents of cassava and cowpea bacterial blight, respectively, in/by insect vectors. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 3, p. 159-169, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos são de grande importância e poderão ser utilizados para o manejo mais efetivo da podridão negra em campos de produção de brássicas no Brasil. Xcc foi recuperada da filosfera de 25 espécies de plantas daninhas coletadas em campos de cultivo, sendo algumas também identificadas como hospedeiras sintomáticas ou favoráveis à colonização endofítica pela bactéria. O controle de *Amaranthus* spp., *Bidens* spp., *Commelina* spp., *Coronopus didymus*, *Cyperus* spp., *Emilia fosbergii*, *Galinsoga parviflora*, *Ipomoea* spp., *Leonurus sibiricus*, *Lepidium virginicum*, *Nicandra physalodes*, *Portulaca oleracea*, *Raphanus raphanistrum*, *Raphanus sativus*, *Solanum americanum* e *Sonchus oleraceus* é recomendado em campos de cultivo. Com relação às plantas cultivadas, abobrinha, cebolinha, crotalária, espinafre, milho e sorgo não demonstraram ser favoráveis à sobrevivência de Xcc na filosfera e rizosfera, e são indicadas em sistemas de rotação com brássicas. A baixa sobrevivência na rizosfera do repolho cultivado em diferentes solos, demonstrou que as propriedades físicas dos solos não influenciaram a sobrevivência de Xcc na rizosfera, mas sim o pH. Quanto à disseminação, considerando as condições em que os experimentos foram conduzidos, *B. tabaci* e *M. persicae* aparentemente não estão envolvidos na disseminação de Xcc em plantas de couve, mas de qualquer forma, o controle desses insetos é recomendado por serem pragas da cultura.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005.
- ALVAREZ, A. M. Black rot of crucifers. *In*: SLUSARENKO, A. J.; FRASER, R. S. S.; VAN LOON, L. C. (ed.). **Mechanisms of resistance to plant diseases**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. cap. 1, p. 21-52.
- ALVAREZ, A. M.; CHO, J. J. Black Rot of cabbage in Hawaii: inoculum source and disease incidence. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, n. 10, p. 1456-1459, 1978.
- ANJUM, N. A. et al. **The plant family Brassicaceae**: contribution towards phytoremediation. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012.
- ARIAS, R. S.; NELSON, S. C.; ALVAREZ, A. M. Effect of soil-matric potential and phylloplanes of rotation-crops on the survival of a bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 2, p. 109-116, 2000.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 145-172, 1995.
- BROWN, J. F. Survival and dispersal of plant parasites: general concepts. *In*: BROWN, J. F.; OGLE, H. J. (ed.). **Plant Pathogens and Plant Diseases**. Armidale: Rockvale Publications, 1997. cap. 12, p. 195-206.
- FAOSTAT. **Statistical databases Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Roma, 2019. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 18 out. 2019.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Visoça: UFV, 2008.
- GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1992.
- GRIESBACH, E.; LÖPTIEN, H.; MIERSCH, U. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson in cabbage *Brassica oleracea* L. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Heidelberg, v. 110, n. 5, p. 461-475, 2003.
- HORTIFRUTI. **Agrianual 2019**: Anuário estatístico da agricultura brasileira, São Paulo, p. 292-295, 2019.
- KOCKS, C. G.; ZADOKS, J. C.; RUISSSEN, M. A. Spatio-temporal development of black rot (*X. campestris* pv. *campestris*) in cabbage in relation to initial inoculum levels in field plots in The Netherlands. **Plant Pathology**, Chichester, v. 48, n. 2, p. 176-188, 1999.

KÖHL, J. et al. Survival of pathogens of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* Gemmifera Group) in crop residues. **Plant Pathology**, Chichester, v. 60, n. 4, p. 661-670, 2011.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

LEBEN, C. **Survival of plant pathogenic bacteria**. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1974.

LEMA, M. et al. Screening for resistance to black rot in *Brassica oleracea* crops. **Plant breeding**, Berlin, v. 131, n. 5, p. 607-613, 2012.

MARINGONI, A. C. et al. Sintomas atípicos de podridão negra em folha de repolho. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 2, p. 185-185, 2016.

MARINGONI, A. C.; SILVA JÚNIOR, T. A. F. Doenças das Brássicas. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, cap. 19, p. 165-173.

MASSOMO, S. M. S. et al. Identification and characterisation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity tests, biolog, rep-PCR and fatty acid methyl ester analysis. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 8, p. 775-789, 2003.

MICHEREFF, S. J. et al. Survey and prevalence of species causing Alternaria leaf spots on brassica species in Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p. 345-348, 2012.

ROMEIRO, S. R. Sobrevivência de bactérias fitopatogênicas e suas implicações. In: _____. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. cap. 12, p. 257-291.

SCHAAD, N. W.; DIANESE, J. C. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 11, p. 1215-1220, 1981.

SCHAAD, N. W.; WHITE, W. C. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, n. 12, p. 1518-1520, 1974.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, n. 1, p. 199-221, 1974.

SHELTON, A. M.; HUNTER, J. E. Evaluation of the potential of the flea beetle *Phyllotreta cruciferae* to transmit *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causal agent of black rot of crucifers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, New York, v. 7, n. 3, p. 308-310, 1985.

SILVA, J. C. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of weeds. **Plant Pathology**, Chichester, v. 66, n. 9, p. 1517-1526, 2017.

SILVA JÚNIOR, T. A. F. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 156, n. 2, p. 399-411, 2020.

SINGH, D.; DHAR, S.; YADAVA, D. K. Genetic and pathogenic variability of Indian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot disease in crucifers. **Current microbiology**, New York, v. 63, n. 6, p. 551, 2011.

STONE, B. W. G.; WEINGARTEN, E. A.; JACKSON, C. R. The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. **Annual Plant Reviews**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 533-556, 2018.

VAN DER WOLF, J. M.; VAN DER ZOUWEN, P. S. Colonization of cauliflower blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via flies (*Calliphora vomitoria*) can result in seed infestation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 11-12, p. 726-732, 2010.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 12, p. 828-840, 2012.

WARWICK, S. I. Brassicaceae in Agriculture. In: SCHMIDT, R.; BANCROFT, I. **Genetics and Genomics of the Brassicaceae**. 1. ed. New York: Springer, 2011. v. 9, cap. 2, p. 33-65.

WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 8, p. 736-742, 1980.

WILLIAMS, P. H. Infectious Diseases. In: RIMMER, S. R.; SHATTUCK, V. I.; BUCHWALDT, L. (ed.). **Compendium of brassica diseases**. Saint Paul: APS Press, 2007. p. 60-62.

ZANDJANAKOU-TACHIN, M. et al. Detection, survival and transmission of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and *X. axonopodis* pv. *vignicola*, causal agents of cassava and cowpea bacterial blight, respectively, in/by insect vectors. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 3, p. 159-169, 2007.