



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Caracterização epidemiológica da podridão mole da
couve-chinesa causada por *Pectobacterium aroidearum***

Joelma Santana Rezende

RECIFE-PE

2017

JOELMA SANTANA REZENDE

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA PODRIDÃO
MOLE DA COUVE-CHINESA CAUSADA POR *Pectobacterium*
*aroidearum***

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientadora: Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Sami Jorge Michereff

RECIFE – PE

2017

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

R467c Rezende, Joelma Santana
Caracterização epidemiológica da podridão mole da couve-chinesa causada por *Pectobacterium aroidearum* / Joelma Santana Rezende. – 2017.
53 f. : il.

Orientador: Marco Aurélio Siqueira da Gama.
Coorientadores: Elineide Barbosa de Souza, Sami Jorge Michereff.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Epidemiologia 2. Severidade 3. *Brassica rapa* var. *pekinensis* I. Gama, Marco Aurélio Siqueira da, orient. II. Souza, Elineide Barbosa de, coorient III. Michereff, Sami Jorge, coorient. IV. Título

CDD 632

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA PODRIDÃO MOLE DA COUVE-
CHINESA CAUSADA POR *Pectobacterium aroidearum***

JOELMA SANTANA REZENDE

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 22/02/2017.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE)

Prof. Dr. Nelson Bernadi Lima (FG)

RECIFE - PE
FEVEREIRO – 2017

*Aos verdadeiros amores da minha vida, meus pais
Jorge de Santana e Maria Tereza da Conceição da
Silva de Santana, pelo exemplo de vida, caráter,
dedicação e amor.*

DEDICO

*Mas os que esperam no Senhor renovarão suas
forças, subirão com asas como águias; correrão, e
não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão.
Isaías 40:31*

*Ao meu esposo, Jefrejan S. Rezende, pelo amor,
paciência e apoio em todos os momentos. Aos
meus irmãos, Janaina e Janderson de Santana,
por todo apoio e amizade na minha vida.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor, força e principalmente por sua misericórdia concedida, permitindo que eu chegasse até aqui;

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

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

A profa. Dr. Elineide Barbosa de Souza, pelo incentivo, orientação neste trabalho e ensinamentos no decorrer do curso, os quais servirão para minha vida profissional e pessoal;

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

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

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelas contribuições necessárias à minha formação;

Aos meus pais, Jorge de Santana e Maria Tereza da Conceição da Silva de Santana, pelo amor, incentivo, confiança e por sempre priorizarem os estudos dos seus filhos, meu eterno agradecimento;

Ao meu esposo, Jefrejan Souza Rezende, por todo amor, carinho, paciência e incentivo em todos os momentos compartilhados;

Aos meus irmãos, Janaina da Conceição de Santana e Janderson da Silva de Santana, pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos de dificuldades;

Aos meus amigos Ana Dulce, Claudeana, Kledson, Leandro Victor e Walkíria, pela ajuda sincera, amizade e por estarem sempre ao meu lado;

A todos os amigos do LAFIBAC: Alessandra, Carla, Elias, Emanuel, Jéssica, Leandro Velez, Pedro, Willams e Nelson, pela amizade, colaboração e por transformar o trabalho diário em momentos agradáveis;

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

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO GERAL.....	09
GENERAL ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO I.....	11
CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA PODRIDÃO MOLE DA COUVE- CHINESA CAUSADA POR <i>Pectobacterium aroidearum</i>	12
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
COUVE-CHINESA.....	12
PODRIDÃO MOLE.....	13
EPIDEMIOLOGIA.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO II.....	22
Influência da concentração de inóculo, temperatura, duração e início da umidade elevada na agressividade de isolados de <i>Pectobacterium aroidearum</i> em couve-chinesa.....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Materiais e Métodos.....	27
Isolados bacterianos.....	27
Temperatura ideal de crescimento <i>in vitro</i> dos isolados.....	28
Efeito da concentração de inóculo sobre a podridão mole.....	28
Efeito da temperatura sobre a podridão mole.....	29
Efeito da duração da umidade elevada sobre a podridão mole.....	29
Efeito do início da umidade elevada sobre a podridão mole.....	30
Análises dos dados.....	30
Resultados	31
Temperatura ideal de crescimento <i>in vitro</i> dos isolados.....	31
Efeito da concentração do inóculo sobre a podridão mole	31
Efeito da temperatura sobre a podridão mole.....	32
Efeito da duração da umidade elevada sobre a podridão mole.....	33
Efeito do início da umidade elevada sobre a podridão mole.....	34

Discussão.....	35
Agradecimentos.....	38
Referências.....	38
CONCLUSÕES GERAIS.....	53

RESUMO GERAL

Dentre as diversas espécies olerícolas produzidas no Brasil, as pertencentes à família Brassicaceae caracterizam-se como as mais abundantes, sobressaindo-se pela sua expressão econômica, riqueza em sais minerais e vitaminas, além de baixo custo de produção. Entre as espécies botânicas pertencentes a esta família, a couve-chinesa destaca-se como uma das hortaliças mais produzidas no estado de Pernambuco. No entanto, o rendimento desta cultura pode ser reduzido devido à ocorrência de uma série de doenças, dentre as quais se destaca a podridão mole. O objetivo desse trabalho foi determinar a temperatura ideal para o crescimento *in vitro* dos isolados, analisar a influência da concentração de inóculo, temperatura e duração e início da umidade elevada sobre a agressividade de cinco isolados de *Pectobacterium aroidearum* (PA). Foram avaliadas concentrações de inóculo de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/mL; temperaturas de 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40 °C; tratamentos com câmara úmida durante 0, 6, 12, 24 e 48 h, com início dos tratamentos imediatamente após as inoculações; e tratamentos com início da câmara úmida as 0, 6, 12, 24 e 48 h após as inoculações. Os dados obtidos foram submetidos às análises de regressão linear e não-linear para relacionar a temperatura, concentração de inóculo, duração e início da umidade elevada aos tamanhos das lesões induzidas pelos isolados de *P. aroidearum*. A escolha do modelo para cada experimento foi determinada pela significância da regressão ($P \leq 0,05$), coeficiente de determinação ($R^2 > 0,95$), distribuição dos resíduos e quadrado médio dos erros. Os valores das variáveis estimadas pelos modelos de regressão em cada experimento foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de LSD ($P \leq 0,05$). A temperatura ideal de crescimento *in vitro* para os isolados de *P. aroidearum* foi de 24,5 °C. As condições que proporcionaram os maiores níveis de severidade da podridão mole em couve-chinesa foram elevada concentração de inóculo de 10^9 UFC/mL, em conjunto com temperatura de 32 °C e umidade relativa elevada, próximo a 100%, durante 48 h. Este é o primeiro estudo realizado para determinação dos fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento da podridão mole causada por *P. aroidearum* em couve-chinesa. Além disso, o conhecimento aqui obtido auxiliará o entendimento de epidemias da podridão mole e o desenvolvimento de estratégias eficientes para o manejo da doença.

Palavras-chave: Epidemiologia • severidade • *Brassica rapa* var. *pekinensis*

GENERAL ABSTRACT

Among the various olerocaric species produced in Brazil, those belonging to the *Brassicaceae* family are characterized as the most abundant; it's major economic expression, richness in minerals and vitamins, as well as low production costs. Among the botanical species belonging to the Brassicaceae family, Chinese cabbage stands out as one of the most produced vegetables in the state of Pernambuco. However, the yield of Chinese cabbage can be reduced due to the occurrence of a number of diseases, in which soft rot stands out. This disease is very frequent in Brazil, being a limiting factor for Chinese cabbage cultivation in the state of Pernambuco. However, the yield of this crop can be reduced due to the occurrence of several diseases, among which soft rot is highlighted. The objective of this work was to determine the ideal temperature for the *in vitro* growth of the isolates, to analyze the influence of inoculum concentration, temperature and duration and onset of high humidity on the aggressiveness of five isolates of *Pectobacterium aroidearum* (PA). Inoculate concentrations of 10^3 to 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 and 10^9 CFU / mL were evaluated; temperatures of 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40 °C; treatments with humid chamber for 0, 6, 12, 24 and 48 h, with the beginning of the treatments immediately after the inoculations; and treatments with beginning of the humid chamber at 0, 6, 12, 24 and 48 h after inoculations. The data obtained were submitted to linear and non-linear regression analysis to relate the temperature, inoculum concentration, duration and beginning of high humidity to the lesion sizes induced by *P. aroidearum* isolates. The choice of the model for each experiment was determined by the significance of the regression ($P \leq 0.05$), determination coefficient ($R^2 > 0.95$), residue distribution and mean squared error. The values of the variables estimated by the regression models in each experiment were submitted to analysis of variance and the averages were compared by the LSD test ($P \leq 0.05$). The ideal *in vitro* growth temperature for *P. aroidearum* isolates was 24.5 °C. The conditions that predisposed the severity of soft rot in Chinese cabbage were high inoculum concentration of 10^9 CFU / mL, together with temperature of 32 °C and high relative humidity, close to 100%, during 48 h. To our knowledge, this is the first study to determine the environmental factors favorable to the development of soft rot caused by *P. aroidearum* in Chinese cabbage in the state of Pernambuco. In addition, the knowledge obtained here will help in the understanding of epidemics of soft rot and the development of efficient strategies for the management of the disease.

Keywords: Epidemiology • Severity • *Brassica rapa* var. *pekinensis*

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA PODRIDÃO MOLE DA COUVE-CHINESA CAUSADA POR *Pectobacterium aroidearum*

INTRODUÇÃO GERAL

1. COUVE-CHINESA

A Brassicaceae caracteriza-se como a família botânica com maior diversidade de espécies oleráceas, abrangendo 350 gêneros e alcançando um total de 3.500 espécies (WARWICK et al., 2000). Os membros dessa família estão presentes nas regiões do Mediterrâneo, sudoeste da Ásia, Ásia Central e costa Ocidental da América do Norte e América do Sul, estando entre as principais hortaliças cultivadas no mundo, considerando a área, volume de produção e consumo (ALMEIDA, 2006). Na maior parte dos casos, essas hortaliças são cultivadas tanto por pequenos quanto por médios produtores (MAROUELLI et al., 2009).

No Brasil, são comercializadas anualmente cerca de 80.000 mil toneladas de brássicas, destacando-se a couve-flor (*Brassica oleraceae* L. var. *botrytis* L.), o brócolis (*B. oleraceae* L. var. *italica* Plenk.), a couve-chinesa (*B. rapa* var. *pekinensis* L.), a couve-folha (*B. oleracea* L. var. *acephala* DC) e o repolho (*B. oleracea* L. var. *capitata* L.) (AGRIANUAL, 2015) como as mais cultivadas. A produção da couve-chinesa e outras hortaliças tem sido estimulada pela mudança de hábito alimentar da população, que passou a consumir hortaliças com maior frequência e a exigir produtos de melhor qualidade (PEREIRA et al., 2016). Além disso, a couve-chinesa é muito nutritiva, sendo considerada como uma excelente fonte de ácido fólico (importante para a formação do sangue) vitaminas A, B e C, cálcio e potássio (EMBRAPA, 2016; SILVA, 2010).

A couve-chinesa tem sido cultivada na Ásia há mais de 1500 anos. Acredita-se que esta planta tenha se originado na China, provavelmente a partir do cruzamento entre o repolho chinês e o nabo (MAROTO; BORREGO, 1995). Caracteriza-se como uma planta de ciclo anual de 60 a 70 dias, cujas folhas apresentam uma nervura central destacada, de coloração branca. As folhas se fecham formando uma cabeça compacta, globular-alongada. As cabeças são colhidas no final do ciclo após a semeadura e embaladas em sacos de malhas plásticas para o transporte até os centros de comercialização (FILGUEIRA, 2008).

A maioria das cultivares de couve-chinesa apresentam altos índices de produção

quando cultivadas em temperaturas entre 15 e 25 °C e são sensíveis a fotoperíodos longos e temperaturas abaixo de 12 °C, condições que induzem a floração prematura (MAROTO; BORREGO, 1995).

No estado de Pernambuco, a couve-chinesa está entre as hortaliças mais comercializadas (CEASA-PE, 2015). Em 2015, Chã Grande produziu o maior volume desta hortaliça (CEASA-PE, 2015). Nesse município, o período de produção ocorre de janeiro a maio, onde existe uma oferta de produtos de melhor qualidade e, por conseguinte, preços mais atrativos, os quais variam entre R\$ 3,00 e R\$ 5,00 (CEASA-PE, 2016). Por outro lado, a busca por preços mais elevados faz com que parte dos agricultores cultive a couve-chinesa no período chuvoso, época favorável à ocorrência de diversos fitopatógenos (MELLO et al., 2011). Nesse contexto, o rendimento da cultura pode ser reduzido devido a uma série de doenças, dentre as quais se destaca a podridão mole causada por fitobactérias pectinolíticas, que tem como principal característica a produção de uma grande quantidade de enzimas como as pectinases, celulasas e proteases, que provocam o colapso da parede celular vegetal, liberando nutrientes para o crescimento da fitobactéria (PÉROMBELON, 2002).

2. PODRIDÃO MOLE

A podridão mole caracteriza-se como a mais destrutiva e importante doença em muitas áreas produtoras de hortaliças do Brasil e do mundo (REN et al., 2001). Encontrada frequentemente no Brasil, tanto no campo quanto na fase de pós-colheita, essa doença é considerada um fator limitante para o cultivo de couve-chinesa e outras hortaliças como alface, pimentão e tomate (MARIANO et al., 2005). Em Pernambuco esta doença é considerada um sério problema para a produção de couve-chinesa (FELIX et al., 2017). Na mesorregião do agreste pernambucano a podridão mole destaca-se pela elevada prevalência e incidência em hortaliças folhosas (SILVA et al., 2007).

As fitobactérias causadoras de podridão mole proporcionam perdas que podem variar de acordo com o valor da cultura, severidade do ataque, condições ambientais, espécies e/ou subespécies envolvidas, condições de cultivo, armazenamento, transporte e comercialização dos produtos (JABUONSKY et al., 1988; PÉROMBELON; KELMAN, 1980). As fitobactérias pectinolíticas já descritas são *Pectobacterium aroidearum* Nabhan et al., *P. atrosepticum* Gardan et al., *P. betavasculorum* (Thomson et al.) Gardan et al., *P. cacticidium* Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* Duarte et al., *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois et al.)

Hauben et al., *P. wasabiae* (Goto and Matsumoto) Gardan et al., *P. cypripedii* (Hori) Brenner et al., *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder et al.) Samson et al., *D. dadantii* Samson et al., *D. dianthicola* Samson et al., *D. dieffenbachiae* Samson et al., *D. paradisiaca* (Fernandez-Borrero and Lopez-Duque) Samson et al., *D. solani* van der Wolf et al., e *D. zae* Samson et al. (DUARTE et al., 2004; HAUBEN et al., 1998; NABHAN et al. 2013; SAMSON et al., 2005). Devido à ausência de especificidade, essas fitobactérias podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, bem como uma mesma planta pode ser infectada por várias espécies ou subespécies deste grupo de fitobactérias (DE BOER et al., 1987).

Dentre as espécies acima, *P. atrosepticum*, *P. betavascularum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (DE BOER et al., 1987), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, (MEW et al., 1976; REN et al., 2001) e *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (SEO et al., 2004), já foram detectadas causando podridão mole em couve-chinesa.

Mais recentemente, isolados de *P. aroidearum* foram detectados causando podridão mole em couve-chinesa (informação verbal)¹ e em abobrinhas (*Cucurbita pepo* L.) cultivadas no município de Chã Grande, em Pernambuco (MORAES et al., 2016), configurando-se como ameaça iminente ao cultivo dessas hortaliças neste estado. Isolados de *P. aroidearum* são Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbicos facultativos, utilizam a pectina e ocasionam depressões em meio semi-seletivo cristal violeta pectato (CVP). Formam colônias brancas, pequenas e planas no meio King's B e apresentam crescimento ótimo entre 28 e 30 °C (NABHAN, 2013). Contudo, embora isolados de *P. aroidearum* tenham se mostrado bastante agressivos em couve-chinesa quando inoculados artificialmente (informação verbal)² não se conhece o potencial destrutivo e o comportamento epidemiológico desta pectobactéria em cultivos de couve-chinesa.

As espécies/subespécies de *Pectobacterium* sobrevivem epifiticamente na filosfera de plantas hospedeiras, como saprófitas no solo, em restos culturais infectados, em material de plantio, em associação com plantas invasoras ou na rizosfera de plantas cultivadas, sendo essas as principais fontes de inóculo primário (GOTO, 1992; PÉROMBELON; KELMAN, 1980). A disseminação ocorre por meio de raízes e tubérculos infectados, pela água, insetos, tratos culturais, homem e implementos agrícolas (PÉROMBELON; KELMAN, 1980).

As fitobactérias pectinolíticas penetram na planta por meio de ferimentos ou aberturas naturais. Após a penetração, as células bacterianas entram em contato com as células vegetais nos espaços intercelulares de tecidos parenquimatosos e eventualmente no tecido vascular,

^{1,2} Informações fornecidas pela Ms. A.J.G. Moraes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em fevereiro de 2017.

no qual se multiplicam produzindo as enzimas pectinolíticas que atuam na lamela média e parede celular. O tecido afetado se desintegra em uma massa pastosa de células desorganizadas rodeadas por fitobactérias e suas enzimas, ocasionando o sintoma de podridão mole (PÉROMBELON; KELMAN, 1980).

O principal fator de patogenicidade e virulência das pectobactérias são enzimas pectinolíticas (também chamadas de pectinases), as quais incluem pectina metil esterase, pectina liase, pectina acetil esterase, pectato liase, e poligalacturonases (HYTYIÄINEN, 2005; MCEVOY et al., 1990). Proteases, celulases e nucleases também são produzidas e secretadas por essas fitobactérias, contribuindo para maceração e apodrecimento dos tecidos (KADO, 2010). É importante mencionar que as pectinases e as celulases são secretadas pelo sistema de secreção tipo II, enquanto as proteases pelo sistema de secreção tipo I (HYTYIÄINEN, 2005; MCEVOY et al., 1990). Quando essas enzimas são liberadas nos espaços intercelulares ocorre à dissolução da lamela média e a separação das células umas das outras, ocasionando a perda da rigidez dos tecidos, os quais se tornam moles. Após à maceração dos tecidos ocorrem fermentações sucessivas, seguindo-se a invasão dos tecidos afetados por micro-organismos saprofíticos, o que resulta na liberação de gases com odor fétido (ROMEIRO, 1995).

Os sintomas da podridão mole em couve-chinesa se iniciam na base da nervura das folhas, as quais entram em contato com o solo quando a planta está próximo do ponto de colheita. A penetração da fitobactéria ocorre através de ferimentos devido ao atrito com o solo, com posterior colonização e maceração dos tecidos conforme descrito acima (KIKUMOTO, 2000; MELLO et al., 2011). Em seguida, a doença progride rapidamente para o caule principal, resultando no colapso de toda a planta (REN et al., 2001; SILVA, 2007).

O controle da podridão mole é uma tarefa árdua dificultada pela ampla gama de plantas hospedeiras e pela sobrevivência das diferentes espécies/subespécies de *Pectobacterium* em restos de cultura no solo (REN et al., 2001). Além disso, tendo em vista que esse patógeno é extremamente agressivo e a doença apresenta um reduzido período de incubação (18 h) (MELLO et al., 2011), o manejo da podridão mole deve ser realizado de forma preventiva, sendo imprescindível evitar ferimentos durante os tratos culturais (REIS, 2017). Ao longo dos anos, diversos estudos foram realizados visando o controle da doença pelo uso de variedades resistentes (REN et al., 2001), plantas transgênicas (FRAY et al., 1999; MÃE et al., 2001), controle biológico (DONG et al., 2004; MANEFIELD et al., 2001; MELLO et al., 2011;), emprego de adubação equilibrada com nitrogênio, boro e cálcio (FLEGO et al., 1997), indutores de resistência (acibenzolar-S-metil) (BENELLI et al., 2004) e

emprego de antibióticos ou fungicidas cúpricos (MELLO et al., 2011; ZAMBOLIM et al., 1997), apresentando níveis variáveis de eficiência.

3. EPIDEMIOLOGIA

Estudos epidemiológicos são importantes para fundamentar o desenvolvimento e a aplicação de medidas de controle para integrar o manejo de doenças de plantas. A importância de uma doença e, portanto, a necessidade de se obter mais recursos para seu controle pode ser estimada por meio de levantamentos epidemiológicos que possibilitem a quantificação da severidade da doença estudada. Tais levantamentos proporcionam a obtenção de dados representativos da doença e permitem a visualização de sua distribuição e período de maior incidência, bem como possibilitam a realização de estimativas do potencial destrutivo do patógeno antes que ele seja disseminado para uma área maior (XAVIER, 2004).

As epidemias de doenças de plantas ocorrem devido a uma perfeita interação dos três fatores que compõem o triângulo da doença (plantas hospedeiras suscetíveis, patógenos virulentos e condições ambientais favoráveis), os quais estão sob a intervenção humana e o efeito do tempo (KRANZ, 1974; ZAMBOLIM, 2014). A temperatura e a umidade são os fatores ambientais que mais afetam o desenvolvimento das epidemias de doenças de plantas (CAMPBELL et al., 1990; VALE et al., 2004). Nesse contexto, o efeito da temperatura sobre o progresso de doenças de plantas, em particular após a infecção, depende da relação específica entre patógeno e hospedeiro. As condições ambientais que favorecem a maior incidência e severidade da podridão mole são temperatura de 30 °C e umidade relativa do ar próxima de 100% (BHAT et al., 2010). No entanto, estas condições foram descritas apenas para podridão mole causada por isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (BHAT et al., 2010).

A umidade, na forma de aerossóis e água corrente, desempenha um papel importante na distribuição e dispersão, promovendo a disseminação de muitos agentes patogênicos na mesma planta ou de uma planta para outra (AGRIOS, 2005). Considerando a podridão mole, a umidade influencia o início e o desenvolvimento da doença, sendo indispensável na fase de penetração, infecção, sobrevivência e disseminação das fitobactérias pectinolíticas (LOPES et al., 2007). Após a penetração, dependendo da temperatura, a presença de água livre conduz rapidamente à anaerobiose dentro do órgão infectado (BURTON 1970). Uma vez que essas fitobactérias são anaeróbicas facultativas, a anaerobiose dentro do tecido infectado apresenta pouco efeito sobre a multiplicação dessas fitobactérias, mas prejudica o sistema de defesa do

hospedeiro dependente de oxigênio (produção de fitoalexinas, compostos fenólicos e radicais livres, entre outros), inibe a lignificação e suberização da parede celular (PÉROMBELON, 2002) e aumenta a turgidez das células vegetais, afetando a integridade da membrana (PÉROMBELON, 2002).

O conhecimento das condições ambientais ideais para o desenvolvimento de *P. aroidearum* e da podridão mole é de grande importância para o entendimento da evolução da doença em determinadas condições climáticas e agrícolas de uma região. Sendo assim, o comportamento dessa doença em função da idade da planta hospedeira, da faixa de temperatura e do período de exposição à umidade, bem como a concentração de inóculo adequada para o estabelecimento de altos níveis de severidade deve ser definido para cada associação patógeno-hospedeiro (NETO et al., 2004). Nesse contexto, não existe informações consistentes sobre essas variáveis considerando a podridão mole causada por *P. aroidearum*. Portanto, o objetivo desse trabalho foi determinar a temperatura ideal para o crescimento *in vitro* dos isolados, analisar a influência da concentração de inóculo, temperatura e duração e início da umidade elevada sobre a agressividade de cinco isolados de *P. aroidearum*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2015.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 952p.

ALMEIDA, D. **Manual de culturas hortícolas**. 1. ed. Editorial Presença, 2006. 346 p.

BENELLI, A. I. H.; DENARDIN, N. D.; FORCELINI, C. A. Ação do acibenzolar-S-metil aplicado em tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 263-267, 2004.

BHAT, K. A.; MASOODI, S. D.; BHAT, N. A.; AHMAD, M.; ZARGAR, M. Y.; MIR, S. A.; BHAT, M. A. Studies on the effect of temperature on the development of soft rot of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Journal of Phytology**, Índia, v. 2, n. 2, p. 64-67, 2010.

BURTON, W. G.; WIGGINTON, M. J. The effect of a film of water upon the oxygen status of a potato tuber. **Potato Research**, Wageningen, v. 13, n. 3, p. 180-186, 1970.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.

CENTRAL DE ABASTECIMENTO DE PERNAMBUCO. Comercialização de produtos. Recife: **Central de abastecimento de Pernambuco**. 2016, Disponível em: <<http://>

<http://www.ceasape.org.br/verCotacao.php?tipo=hortalicas>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

CENTRAL DE ABASTECIMENTO DE PERNAMBUCO. Comercialização de produtos. Recife: **Central de abastecimento de Pernambuco**, 2015. Disponível em: <<http://www.ceasape.org.br/calend.php>>. Acesso em: 07 fev. 2017

DE BOER, S. H.; VERDONCK, L.; VRUGGINK, H.; HARJU, P.; BANGS, H. O.; DE LEY, J. Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 63, n. 6, p. 487-495, 1987.

DONG, Y. H.; ZHANG, X. F.; XU, J. L.; ZHANG, L. H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 2, p. 954-960, 2004.

DUARTE, V.; DE BOER, S.H.; WARD, L. J; OLIVEIRA, A. M. R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 3, p. 535-545, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) – **Hortalças. Couve-chinesa**. Disponível em http://www.cnph.embrapa.br/laborato/pos_colheita/dicas/couve_chinesa.htm. Acesso em: 06 fev. 2017.

FELIX, K. C. S.; SILVA, C. L.; OLIVEIRA, W. J.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. Calcium-mediated reduction of soft rot disease in Chinese cabbage. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 147, n. 1, p. 73-84, 2017.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.

FLEGO, D.; PIRHONEN, M.; SAARILAHTI, H.; PALVA, T. K.; TAPIO P. E. Control of virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 25, n. 5, p. 831-838, 1997.

FRAY, R. G.; THROUP, J. P.; DAYKIN, M.; WALLACE, A.; WILLIAMS, P.; STEWART, G. S. A. B.; GRIERSON, D. Plant genetically modified to produce *N*-acylhomoserine lactones communicate with bacteria. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 10, p. 1017-1020, 1999.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego. Academic Press. 1992.

HAUBEN, L.; MOORE, E. R.; VAUTERIN, L.; STEENACKERS, M.; MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; SWINGS, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, n. 3, p. 384-397, 1998.

HYTYIÄINEN, H. **Regulatory networks controlling virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora***. 2005. 57 f. Tese (Mestrado) - Faculty of Biosciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2005.

- JABUONSKY, R. E.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; TAKATSU, A. Influência da temperatura no dano causado por *Erwinia* spp. em tubérculos de batateira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 4, p. 317-319, 1988.
- KADO, C. I. **Plant bacteriology**. Saint Paul: APS, 2010. 336 p.
- KIKUMOTO, T. Ecology and biocontrol of soft rot of chinese cabbage. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 66, n. 3, p. 275-277, 2000.
- KRANZ, J. Comparison of epidemics. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 355-374, 1974.
- LOPES, C. A.; DUVAL, A. M. Q. **Doenças bacterianas**. In: LOPES, C. A.; AVILA, A. C. (Org.). Doenças do tomateiro. 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007, p. 53-73.
- MÃE, A.; MONTESANO, M.; KOIV, V.; PALVA, T. Transgenic plant producing the bacterial pheromone *N*-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 9, p. 1035-1042, 2001.
- MCEVOY, J. L.; MURATA, H.; CHATTERJEE, A. K. Molecular cloning and characterization of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase gene that responds to DNA-damaging agents. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 6, p. 3284-3289, 1990.
- MANEFIELD, M.; WELCH, M.; GIVSKOV, M.; SALMOND, G. P. C.; KJELLEBERG, S. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 205, n. 1, p. 131-138, 2001.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ALVARADO, I. C. M.; SILVA, A.M. F. Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 2, p. 121-153, 2005.
- MAROTO BORREGO, J. V. M. **Horticultura herbácea especial**. Madrid: Mundi-Prensa, 1995. 615 p.
- MARQUELLI, W. A.; ABDALLA, R. P.; MADEIRA, N. R. Irrigação de repolho em sistema de plantio direto. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 19, n. 112, p. 32-34, 2009.
- MELLO, M. R. F. SILVEIRA, E. B.; VIANA, I.O.; GUERRA, M.L.; MARIANO, R. L. R. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 78-83, 2011.
- MEW, T. W.; HO, W. C.; CHU, I. Infectivity and survival of soft-rot bacteria in chinese cabbage. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, n. 1, p. 1325-1327, 1976.
- MORAES, A. J. G.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, A. M. F.; LIMA, N. B.; PEIXOTO, A. R.; GAMA, M. A. S. First Report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing soft rot of *cucurbita pepo* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, n. 2, p. 379, 2016.

NABHAN, S.; DE BOER, S. H.; MAISS, E.; WYDRA, K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 7, p. 2520-2525, 2013.

NETO, C. R. B.; GORGATI, C. Q.; PITELLI, R. A. Influência da concentração de inóculo e da idade da planta na intensidade de doença causada por *Fusarium graminearum* em *Egeria densa* e *E. najas*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 282-288, 2004.

PEREIRA, E. M.; DE FARIAS LEITE, D. D.; DE LIMA FIDELIS, V. R.; PORTO, R. M.; DE OLIVEIRA, M. I. V.; MAGALHAES, W. B. Caracterização físico-química de hortaliças tipo folha comercializadas no Brejo Paraibano. **Agropecuária Técnica**, Areia, v. 37, n. 1, p. 19-22, 2016.

PÉROMBELON, M. C. M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of pathogenesis. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 1-12, 2002.

PÉROMBELON, M. C. M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot erwinias. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 361-387, 1980.

REIS, A.; MOURA, A. P.; LOPES, C. A.; LIMA, C. E. P.; MORETTI, C. L.; MENDES, D. G.; RESENDE, F. V.; HENZ, G. P.; PINHEIRO, J. B.; GUIMARÃES, J. A.; FILHO, M. M.; LIMA, M. F.; BOTREL, N.; VILELA, N. J.; MADEIRA, N. R.; CARVALHO, P. G. B.; SOUZA, R. B.; CAVALIERI, S. D.; OLIVEIRA, V. R.; MOROUELLI, W. A. **Árvore do conhecimento**. EMBRAPA, 2012. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/couve/Abertura.html>>. Acesso em: 09 de fev. de 2017.

REN, J.; PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Genetics and population improvement resistance to bacterial soft rot chinese cabbage. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 3, p. 197-207, 2001.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Imprensa Universitária, UFV 1995. 283p.

SAMSON, R.; LEGENDRE, J. B.; CHRISTEN, R.; ACHOUAK, W.; GARDAN, L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 4, p. 1415-1427, 2005.

SEO S. T.; KOO J. H.; HUR J. H.; LIM C. K. Characterization of Korean *Erwinia carotovora* strains from potato and chinese cabbage. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v. 20, n. 4, p. 283-288, 2004.

SILVA A. M. F.; MARIANO R. L. R.; MICHEREFF S. J.; SILVEIRA E. B.; MEDEIROS F. H. V., Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface e couve-chinesa em Pernambuco. **Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 2, p. 84-93, 2007.

SILVA, J. M. **Acelga e suas propriedades**. 2010. Disponível em: <http://soverduras.blogspot.com/2010/05/accelga-e-suas-propriedades.html>. Acesso em 06 de

dez. de 2016.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, L. C.; LIBERATO, J. R.; DIAS, A. P. Influência do clima no desenvolvimento de doenças de plantas. In: JESUS JR., W. C.; VALE, F. X. R.; JESUS JR., W. C.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, 2004. p. 49-87.

WARWICK, S. I.; FRANCIS, A.; FLECHE, J. L. A. **Guide to the wild germplasm of brassica and allied crops (tribe Brassiceae, Brassicaceae)** 2. ed. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, 2000.

XAVIER RIBEIRO, F. V. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Editora Perfil. Belo Horizonte, 2004.

ZAMBOLIM, L., JESUS JUNIOR, W.C., RODRIGUES, F.A. **O Essencial da fitopatologia - epidemiologia de doenças de plantas**. 1 ed. v. 2 Viçosa: Imprensa Universitária de UFV, 2014, 3p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Eds.) **Controle integrado das doenças de hortaliças**. 1 ed. Viçosa: Editora UFV, 1997. 122 p.

Capítulo II

Influência da concentração de inóculo, temperatura, duração e início da umidade elevada na agressividade de isolados de *Pectobacterium aroidearum* em couve-chinesa

Influência da concentração de inóculo, temperatura, duração e início da umidade elevada na agressividade de isolados de *Pectobacterium aroidearum* em couve-chinesa

Joelma Santana Rezende • Claudeana Souza da Conceição • Ana Dulce Botelho Baia • Elineide Barbosa de Souza • Sami Jorge Michereff • Marco Aurélio Siqueira da Gama

Accepted: / Published online:

J. S. Rezende¹ • C. S. Conceição¹ • A. D. B. Baia¹ • E. B. Souza² • S. J. Michereff¹ • M. A. S. Gama¹ (✉)

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil.

²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil.

E-mail: marco.gama@ufrpe.br

Resumo

A couve-chinesa destaca-se como uma das hortaliças mais produzidas no estado de Pernambuco. Por sua vez, a podridão mole é bastante frequente no Brasil, sendo um fator limitante para o cultivo de couve-chinesa no estado de Pernambuco. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi determinar a temperatura ideal para o crescimento *in vitro* dos isolados, analisar a influência da concentração de inóculo, temperatura e duração e início da umidade elevada sobre a agressividade de cinco isolados de *Pectobacterium aroidearum*. Os

dados obtidos foram submetidos às análises de regressão linear e não-linear. A escolha do modelo para cada experimento foi determinada pela significância da regressão ($P \leq 0,05$), coeficiente de determinação ($R^2 > 0,95$), distribuição dos resíduos e quadrado médio dos erros. Os valores das variáveis estimadas pelos modelos de regressão em cada experimento foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de LSD ($P \leq 0,05$). A temperatura ideal de crescimento *in vitro* para os isolados de *P. aroidearum* foi de 24,5 °C. As condições que predispuseram a ocorrência de severidade da podridão mole em couve-chinesa foram elevada concentração de inóculo (10^9 UFC/mL), em conjunto com temperatura de 32 °C e umidade relativa elevada, próxima a 100% durante 48 h. Esse é o primeiro estudo realizado para determinação dos fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento da podridão mole causada por *P. aroidearum* em couve-chinesa. Além disso, o conhecimento aqui obtido auxiliará o entendimento de epidemias da podridão mole e o desenvolvimento de estratégias eficientes para o manejo da doença.

Palavras-chave: Epidemiologia • severidade • *Brassica rapa* var. *pekinensis* • podridão mole.

Abstract

Chinese cabbage stands out as one of the most produced vegetables in the state of Pernambuco. On the other hand, soft rot is quite frequent in Brazil, being a limiting factor for Chinese cabbage cultivation in the state of Pernambuco. In this context, the objective of this work was to determine the ideal temperature for the *in vitro* growth of the isolates, to analyze the influence of inoculum concentration, temperature and duration and onset of high humidity on the aggressiveness of five *Pectobacterium aroidearum* isolates. The data were submitted to linear and non-linear regression analysis. The choice of the model for each experiment was determined by the significance of the regression ($P \leq 0.05$), determination coefficient ($R^2 > 0.95$), residue distribution and mean squared error. The values of the variables estimated by

the regression models in each experiment were submitted to analysis of variance and the averages were compared by the LSD test ($P \leq 0.05$). The ideal *in vitro* growth temperature for *P. aroidearum* isolates was 24.5 °C. The conditions that predisposed the severity of soft rot in Chinese cabbage were high inoculum concentration of 10^9 CFU / mL with temperature of 30 °C, and high relative humidity, close to 100% during 48h. To our knowledge, this is the first study to determine the environmental factors favorable to the development of soft rot caused by *P. aroidearum* in Chinese cabbage in the state of Pernambuco. In addition, the knowledge obtained will help in the understanding of epidemics of soft rot and the development of efficient strategies for the management of the disease.

Keywords: Epidemiology • severity • *Brassica rapa* var. *pekinensis* • soft rot.

Introdução

A couve-chinesa (*Brassica rapa* var. *pekinensis* L.) está entre as hortaliças mais comercializadas no estado de Pernambuco, Brasil. Em 2015, o principal município pernambucano produtor de couve-chinesa foi Chã Grande (CEASA-PE, 2015), localizado na zona da mata desse estado. Tradicionalmente, a comercialização desta hortaliça ocorre de janeiro a maio, quando existe a oferta de produtos de melhor qualidade (CEASA-PE, 2015). No entanto, a busca por preços mais elevados leva parte dos agricultores a fazer o cultivo no período chuvoso, época favorável à ocorrência de diversos fitopatógenos (Mello et al., 2011). Nesse contexto, o rendimento da couve-chinesa pode ser reduzido devido a uma série de doenças, dentre as quais se destaca a podridão mole causada por fitobactérias pectinolíticas (Pérombelon, 2002).

A podridão mole é a mais destrutiva e importante doença em muitas áreas produtoras de hortaliças do Brasil e do mundo (Ren et al., 2001), sendo encontrada tanto no campo quanto na fase de pós-colheita, sendo frequentemente um fator limitante para o cultivo de

couve-chinesa, alface, pimentão e tomate (Mariano et al., 2005). Em Pernambuco essa doença é considerada um sério problema para produção de couve-chinesa (Felix et al., 2017; Silva et al., 2007).

Os sintomas da podridão mole ocorrem na base e nervura das folhas, as quais entram em contato com o solo quando a planta está próximo do ponto de colheita. A penetração da fitobactéria ocorre através de ferimentos, com posterior colonização dos espaços intercelulares e maceração dos tecidos (Kikumoto, 2000; Mello et al., 2011). A doença progride rapidamente para o caule, resultando no colapso de toda a planta (Ren et al., 2001). A desintegração do tecido vegetal deve-se a perda de componentes da parede celular e a liberação dos fluidos celulares (Davidsson et al., 2013).

As perdas provocadas por fitobactérias pectinolíticas podem variar de acordo com o valor da cultura, severidade do ataque, condições ambientais, gênero, espécies/subespécies envolvidas, condições de cultivo, armazenamento, transporte e comercialização dos produtos (Jabuonsky et al., 1988; Pérombelon; Kelman, 1980). Devido à ausência de especificidade, essas fitobactérias podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, bem como uma mesma planta hospedeira pode ser infectada por diferentes gêneros, espécies ou subespécies de fitobactérias pectinolíticas (De Boer et al., 1987). Dentre as fitobactérias pectinolíticas, apenas *Pectobacterium atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (De Boer et al., 1987), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, (Ren et al., 2001) e *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Seo et al., 2004), foram detectadas causando podridão mole em couve-chinesa.

Pectobacterium aroidearum foi relatada causando podridão mole em monocotiledôneas e dicotiledôneas (Nabhan et al., 2013), em batata no Líbano (Moretti et al., 2016). Isolados de *P. aroidearum* foram também detectados causando podridão mole em abobrinha cultivadas ao lado de couve-chinesa na zona da mata de Pernambuco (Moraes et al., 2016), constatando-se elevada agressividade dessa fitobactéria a couve-chinesa.

O conhecimento dos efeitos da temperatura e da umidade no desenvolvimento de doenças de plantas facilita a prevenção de epidemias através do uso de estratégias mais eficientes de controle (Zambolim, 2014). A temperatura e a umidade na superfície da planta são os fatores ambientais que afetam mais intensamente o início e o progresso de doenças infecciosas (Silveira et al., 2004). Nesse sentido, as condições ambientais que favorecem a maior incidência e severidade da podridão mole são temperatura de 30 °C e umidade relativa do ar próxima de 100% (Bhat et al., 2010). No entanto, estas condições foram descritas apenas para podridão mole causada por isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

A obtenção de informações sobre o comportamento das doenças em função da faixa de temperatura e do período de exposição à umidificação, bem como a concentração de inóculo adequada para o estabelecimento de altos níveis de severidade devem ser definidos para cada associação patógeno-hospedeiro (Neto et al., 2004). Nesse contexto, embora essas variáveis epidemiológicas sejam fatores primordiais para infecção e posterior desenvolvimento da podridão mole, não existem informações consistentes sobre o comportamento da doença, causada por *P. aroidearum* em couve-chinesa. Portanto, o objetivo desse estudo foi analisar a influência da concentração de inóculo, temperatura e duração e início da umidade na agressividade de cinco isolados de *P. aroidearum* na couve-chinesa.

Materiais e Métodos

Isolados bacterianos

Em todos os experimentos foram utilizados cinco isolados de *P. aroidearum* (CRMPA8, CRMPA22, CRMPA158, CRMPA173 e CRMPA174), pertencentes à Coleção de Culturas Rosa Mariano (CRM) do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Em todos os experimentos, as suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro (Analyser 500 M, Brasil) para $A_{570} = 0,36$, que corresponde a 10^9 UFC/mL.

Temperatura ideal de crescimento *in vitro* dos isolados

Alíquotas de 0,5 mL das suspensões bacterianas foram depositadas em tubos de ensaio contendo 4,5 mL de meio de cultura líquido NYD (10 g de dextrose; 5 g de extrato de levedura; 3 g de extrato de carne e 5 g de peptona, completando-se até 1000 mL com água destilada). Os isolados foram incubados em estufas tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) nas temperaturas de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C durante 48 h. Após a incubação, o crescimento dos isolados, nas diferentes temperaturas, foi avaliado em espectrofotômetro a 570 nm, lendo-se a absorbância das suspensões. O controle negativo foi composto por 4,5 mL de meio NYD acrescido de 0,5 mL de ADE. Cada isolado foi considerado como um tratamento e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio.

Efeito da concentração de inóculo sobre a podridão mole

Os isolados foram cultivados em meio NYDA (NYD acrescido de 20 g de ágar) por 36 h a 24,5 °C e a concentração das suspensões bacterianas foram ajustadas para 10^9 UFC/mL, seguindo-se a realização de diluições em série até a concentração de 10^3 UFC/mL (Silva, 2016). Nervuras centrais de folhas de couve-chinesa com o limbo foliar removido foram perfuradas a 2,5 mm de profundidade em dois pontos. Sobre os ferimentos foram depositados 10 µL das suspensões bacterianas (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/mL). Nervuras tratadas similarmente com ADE constituíram o controle negativo. Após a inoculação, as nervuras foram dispostas sobre placas de Petri e colocadas dentro de bandejas de plástico, as quais foram recobertas com sacos plásticos transparentes para criação de uma câmara úmida. Em seguida, as bandejas foram incubadas em B.O.D. à temperatura de 32 °C por 48 h. As avaliações foram realizadas em intervalos de 6 h até completar 48 h após a inoculação, determinando-se o tamanho da lesão, estimado pela medição das lesões em sentidos opostos com auxílio de um paquímetro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado,

em arranjo fatorial, representado por cinco isolados e sete concentrações de inóculo, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma nervura central contendo dois pontos de inoculação.

Efeito da temperatura sobre a podridão mole

Os isolados foram cultivados em meio NYDA por 36 h a 24,5 °C e a concentração das suspensões bacterianas foram ajustadas para 10^9 UFC/mL. As inoculações foram realizadas conforme já descrito e as nervuras incubadas em B.O.D. nas temperaturas 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40 °C com câmara úmida por 48 h. Nervuras tratadas similarmente com ADE constituíram o controle negativo. As avaliações foram realizadas conforme descrito no experimento anterior. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial, representado por cinco isolados e sete temperaturas, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma nervura central contendo dois pontos de inoculação.

Efeito da duração da umidade elevada sobre a podridão mole

As nervuras foram inoculadas com as suspensões bacterianas (10^9 UFC/mL) conforme descrito anteriormente, sendo submetidas a tratamento com câmara úmida imediatamente após as inoculações durante 0, 6, 12, 24 e 48 h. As diferentes durações de molhamento foram obtidas por meio da retirada da câmara úmida após cada tempo estipulado. Nervuras tratadas similarmente com ADE constituíram o controle negativo. A incubação foi realizada em B.O.D. à temperatura de 32 °C e as avaliações foram realizadas conforme descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial, representado por cinco isolados e cinco períodos de molhamento, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma nervura central contendo dois pontos de inoculação.

Efeito do início da umidade elevada sobre a podridão mole

As nervuras foram inoculadas com as suspensões bacterianas (10^9 UFC/mL) conforme descrito anteriormente, sendo submetidas à tratamentos com câmara úmida as 0, 6, 12, 24 h e 48 h sem câmara úmida após as inoculações. O tratamento teve início colocando-se a câmara úmida após cada tempo estipulado. As condições de incubação e avaliações foram realizadas conforme descrito no experimento anterior. Os experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial, representado por cinco isolados e cinco etapas de início de molhamento, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma nervura central contendo um ponto de inoculação.

Análises dos dados

Todos os experimentos foram realizados duas vezes. Os dados das duas replicações independentes, para cada experimento, foram analisados em conjunto devido à presença de homogeneidade nas variâncias, conforme verificado pelo teste de Levene ($P > 0,05$). Os dados obtidos foram submetidos às análises de regressão linear e não-linear para relacionar a temperatura, concentração de inóculo, duração da umidade elevada e início da umidade elevada aos tamanhos das lesões induzidas pelos isolados de *P. aroidearum*. A escolha do modelo para cada experimento foi determinada pela significância da regressão ($P \leq 0,05$), coeficiente de determinação ($R^2 > 0,95$), distribuição dos resíduos e quadrado médio dos erros. Os valores das variáveis estimadas pelos modelos de regressão em cada experimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste da diferença mínima significativa (LSD) de Fisher ($P \leq 0,05$). A determinação da temperatura ótima *in vitro* e as análises de regressão foram realizadas com auxílio do programa TableCurve™ 2D 5.01 (Systat Software Inc., Chicago, EUA). O teste de Levene, as análises de variância e as comparações de medias foram realizadas com auxílio do programa Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, EUA).

Resultados

Temperatura ideal de crescimento *in vitro* dos isolados de *P. aroidearum*

Foi observado crescimento bacteriano na faixa de 10 a 40 °C, com a temperatura de 25 °C proporcionando maior crescimento para todos os isolados (Figura 1). A temperatura ideal de crescimento variou de 23 °C, para o isolado CRMPA22, a 26 °C, para o isolado CRMPA173. Considerando todos os isolados, a temperatura média ótima de crescimento *in vitro* foi de 24,5 °C.

Efeito da concentração do inóculo sobre a podridão mole

Os cinco isolados de *P. aroidearum* foram capazes de causar doença a partir da concentração mais baixa (10^3 UFC/mL). Na concentração mais alta (10^9 UFC/mL), todos os isolados apresentaram maior agressividade.

O modelo de regressão polinomial do quarto grau [$y=a+bx+cx^2+dx^3+ex^4$] proporcionou excelente ajuste aos dados de tamanho das lesões em função da concentração de inóculo para todos os isolados de *P. aroidearum*, com valores de R^2 variando entre 0,9891 e 0,9977. Neste modelo, y representa o tamanho da lesão em determinada concentração de inóculo (x), enquanto a , b , c , d e e são parâmetros da regressão. Com o cálculo das derivadas desses parâmetros foram estimadas as concentrações de inóculo máxima (CI_{max}) e mínima (CI_{min}) para o desenvolvimento das lesões, os tamanhos mínimo (Y_{min}) e máximo (Y_{max}) das lesões, bem como a área abaixo da curva de progresso da lesão em função da concentração do inóculo (AACCI).

Os valores da CI_{min} e CI_{max} para todos os isolados foram de 1×10^3 e 1×10^9 UFC/mL, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre os isolados. Os isolados não diferiram estatisticamente ($P>0,05$) quanto ao Y_{min}, com valores variando de 1,1 a 1,3 mm (Tabela 1). Houve diferença significativa ($P\leq 0,05$) entre os isolados para Y_{max} e AACCI, com o isolado CRMPA158 apresentando os maiores valores para essas variáveis

(6,1 e 17,3, respectivamente) e diferindo significativamente dos demais.

Efeito da temperatura sobre a podridão mole

A maior severidade da doença para os cinco isolados de *P. aroidearum* foi proporcionada pela temperatura de 30 °C (Figura 3). Nesta temperatura, o isolado CRMPA158 comportou-se como o mais agressivo, enquanto os isolados CRMPA174 e CRMPA173 comportaram-se com agressividade intermediária e os isolados CRMPA8 e CRMPA22 apresentaram-se como os menos agressivos.

O modelo de regressão polinomial cúbica [$y=a+bx+cx^2+dx^3$] proporcionou excelente ajuste aos dados de tamanho das lesões em função da temperatura para todos os isolados de *P. aroidearum*, com valores de R^2 variando entre 0,9686 e 0,9957. Neste modelo, y representa o tamanho da lesão em determinada temperatura (x), enquanto a , b , c e d são parâmetros da regressão. Com o cálculo das derivadas desses parâmetros foram estimadas as temperaturas ótima (T_{opt}) e mínima (T_{min}) para o desenvolvimento das lesões, os tamanhos mínimo (Y_{min}) e máximo (Y_{max}) das lesões, bem como a área abaixo da curva de progresso da lesão em função da temperatura (AACTE).

As T_{opt} s calculadas para expressão da maior agressividade variaram de 31,1 a 33 °C, sendo constatadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os isolados. O isolado CRMPA8 apresentou a T_{opt} mais alta, diferindo estatisticamente das T_{opt} s dos demais isolados (Tabela 2). Para a variável T_{min} , todos os isolados obtiveram temperatura de 15 °C, não havendo diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os isolados. Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os isolados quando considerado o Y_{min} , com os isolados CRMPA158 e CRMPA174 apresentando os maiores valores de agressividade com 3,1 mm e 2,7 mm, respectivamente, e diferindo dos isolados CRMPA8, CRMPA22 e CRMPA173, os quais obtiveram os valores de 1,5 mm 1,8 mm e 1,5 mm, respectivamente. Considerando o Y_{max} , o isolado CRMPA158 foi o mais agressivo com 7,0 mm, diferindo significativamente dos isolados CRMPA8 e

CRMPA22, os quais foram menos agressivos, com lesões de 5,2 e 5,1 mm, respectivamente. Com base na AACTE, o isolado CRMPA158 caracterizou-se como mais agressivo com um valor de 133,2, enquanto os isolados CRMPA8 e CRMPA22 caracterizaram-se como menos agressivos, com valores de 95,7 e 94,1, respectivamente.

Efeito da duração da umidade elevada sobre a podridão mole

As nervuras de couve-chinesa inoculadas com os isolados de *P. aroidearum* desenvolveram sintomas de podridão mole independente da presença de câmara úmida, embora todos os isolados tenham apresentado maior diâmetro da lesão para o tratamento com 48 horas de câmara úmida (Figura 4).

O modelo de regressão não linear sigmoide, com três parâmetros, $[y = a/(1 + \exp(-(x - b/c)))]$ propiciou excelente ajuste aos dados de tamanho das lesões em função do tempo de duração da umidade relativa elevada para todos os isolados de *P. aroidearum*, com valores de R^2 variando entre 0,9515 e 0,9985. Neste modelo, y representa o tamanho da lesão em determinado tempo de umidade relativa elevada (x). O parâmetro a representa o valor de y antes da transição, sendo interpretado como o tamanho máximo da lesão no maior tempo de duração da umidade elevada (Y_{max}). O parâmetro b representa o valor de x no centro da transição, sendo interpretado como tempo de duração da umidade elevada para que a lesão atinja a metade do tamanho máximo (DU_{met}). O parâmetro c é relacionado à forma da curva e não propicia interpretação biológica. Com o cálculo das derivadas desses parâmetros foram estimados os tempos de duração da umidade relativa elevada para que a lesão atinja o tamanho mínimo (DU_{min}) e máximo (DU_{opt}), o tamanho mínimo da lesão (Y_{min}) e a área abaixo da curva de progresso da lesão em função do tempo de umidade elevada (AACDU).

Considerando o DU_{met} , foram verificadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os isolados, com o menor DU_{met} para o isolado CRMPA158, com 6,3 horas, e maior DU_{met} para o isolado CRMPA173, com 13,5 horas (Tabela 3). Considerando Y_{min} , Y_{max} e a

AACDU, o isolado CRMPA22 apresentou os menores valores, com 1,2 mm, 4,4 mm e 170,9, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais isolados, os quais não diferiram entre si. Os valores da DU_{min} e DU_{opt} para todos os isolados foram de 0 e 48 h, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre os isolados.

Efeito do início da umidade elevada sobre a podridão mole

Todos os isolados de *P. aroidearum* expressaram maior agressividade quando submetidos à câmara úmida às 6 horas após as inoculações (Figura 5). A agressividade dos isolados foi reduzida com o aumento do intervalo de tempo para início da câmara úmida. Os menores níveis de agressividade foram observados nos tratamentos às 48 horas após as inoculações.

O modelo de regressão não linear pico de pulso [$y = 4a \exp((-x-b)/c) / (1 - \exp(-(x-b)/c))$] propiciou excelente ajuste aos dados de tamanho das lesões em função do tempo de início da umidade relativa elevada para todos os isolados de *P. aroidearum*, com valores de R² variando entre 0,9683 e 0,9966. Neste modelo, y representa o tamanho da lesão em determinado tempo de início da umidade (x). O parâmetro b representa o valor de x no centro da transição, sendo interpretado como tempo de início da umidade elevada para que a lesão atinja a metade do tamanho máximo (IU_{met}). Os parâmetros a e c estão relacionados à forma da curva e não propiciam interpretações biológicas. Com o cálculo das derivadas desses parâmetros foram estimados o tempo de início da umidade relativa elevada para que a lesão atinja o tamanho máximo (IU_{opt}), os tamanhos mínimo (Y_{min}) e máximo (Y_{max}) das lesões, bem como a área abaixo da curva de progresso da lesão em função do início da umidade elevada (AACIU).

Os isolados de *P. aroidearum* não diferiram significativamente ($P > 0,05$) em relação ao tempo de início da câmara úmida para IU_{opt}, variando entre 5,3 a 6,8 horas (Tabela 4). Foram observadas diferenças significativas para IU_{met}, com o isolado CRMPA173 obtendo o

maior tempo com 4,6 horas e diferindo estatisticamente dos isolados CRMPA8 e CRMPA174, com 3 e 3,3 horas, respectivamente. Houve diferença significativa para Y_{min} , Y_{max} e AACIU, com o isolado CRMPA158 apresentando os maiores valores com 3,0 mm, 6,6 mm e 129,3, respectivamente, e diferindo significativamente dos demais isolados.

Discussão

A podridão mole da couve-chinesa tem ocorrência generalizada em cultivos localizados no estado de Pernambuco (região do Nordeste brasileiro) (Mariano et al., 2005). No presente estudo, cinco isolados de *P. aroidearum* foram avaliados quanto ao efeito da concentração de inóculo, temperatura e umidade sobre o desenvolvimento da doença, por se tratar de uma espécie nova do gênero *Pectobacterium*, que causa podridão mole tanto em mono quanto em dicotiledôneas (Nabahn et al., 2013) e ainda não existirem estudos sobre o comportamento epidemiológico desse patógeno.

Para que ocorra máximo crescimento bacteriano, as condições ideais de temperatura são imprescindíveis. Temperaturas extremas podem influenciar a absorção de nutrientes, o crescimento e a sobrevivência dos organismos, determinando, de modo geral, a velocidade das reações metabólicas (Barbosa; Torres, 1999). Portanto, o crescimento bacteriano ótimo *in vitro* foi calculado antes da realização dos estudos epidemiológicos da podridão mole em couve-chinesa. A temperatura ideal para cada isolado variou de 23 a 26 °C. Essa diferença entre isolados pode ser devido à elevada variabilidade observada dentro de espécies do gênero *Pectobacterium* (Mills et al., 2006). A temperatura média encontrada foi de 24,5 °C, sendo utilizada como padrão para cultivo dos isolados e preparo das suspensões bacterianas nos experimentos seguintes. Estes resultados ficaram próximos daqueles encontrados por Du Raan et al. (2016), que obtiveram como temperaturas ideais para o crescimento de *P. atrosepticum*, *P. wasabiae*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* e 26, 30, 31 e 32°C respectivamente.

Verificou-se um aumento da agressividade com o incremento da concentração de inóculo de 10^3 UFC/mL para 10^9 UFC/mL. O aumento da severidade da doença com a elevação da concentração de inóculo do patógeno ressalta a importância da redução do inóculo para minimizar os riscos de epidemias, uma vez que a disponibilidade e a quantidade de inóculo são pré-requisitos para o desenvolvimento de sintomas (Senhor et al., 2008). Além disso, em diversos patossistemas, a ocorrência de epidemias em um curto espaço de tempo está diretamente ligada a concentrações de inóculo do patógeno dentro ou próximo dos campos com plantas hospedeiras (Vale et al., 2004).

A temperatura é um fator particularmente importante no desenvolvimento do processo infeccioso, sendo frequentemente correlacionado com a epidemiologia da doença (Marcuzzo et al., 2009). Nesse sentido, verificou-se uma maior severidade da doença na temperatura de 30 °C. Semelhantemente, Bhat et al.(2010) e Raju et al. (2008) observaram que a temperatura ótima para o desenvolvimento da podridão mole causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em repolho e rabebanete é de 30 °C, respectivamente. O desenvolvimento da podridão mole em diferentes espécies de plantas apresenta uma faixa que varia de 30 a 37 °C (Farrar et al., 2000). No entanto, temperaturas em torno de 30 °C estão diretamente associadas a maior severidade da podridão mole (Oliveira et al., 2014).

Todos os isolados de *P. aroidearum* causaram lesão a partir de 10 °C. Resultados de outras espécies de *Pectobacterium* causando doença em temperaturas baixas foram encontrados por Moh et al. (2012), os quais verificaram que a temperatura mínima para que ocorresse o desenvolvimento de podridão mole em tubérculos de batata por *P. atrosepticum* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi de 10 °C e 20 °C, respectivamente, quando trabalharam com modelos para previsão dos efeitos combinados da temperatura e umidade relativa. No presente estudo, houve diminuição do diâmetro da lesão a partir de 40 °C, sugerindo redução do metabolismo da fitobactéria, visto que temperaturas mais elevadas modificam a taxa de crescimento e a atividade metabólica de patógenos e sua capacidade de

causar doença (Hugouvieux et al., 1996). Além disso, temperaturas mais altas também resultam em morte celular devido à desnaturação das proteínas, colapso das membranas citoplasmáticas e lise térmica (Madigan et al., 2006).

As nervuras inoculadas com *P. aroidearum* desenvolveram sintomas de podridão mole independentemente da presença de câmara úmida. Para todos os isolados o diâmetro máximo da lesão foi observado com 48 h de umidade elevada, havendo um aumento da agressividade com o aumento do período de câmara úmida. Nesse sentido, diversos estudos demonstraram que períodos mais longos de molhamento foliar favorecem o aumento da severidade da doença (Godoy et al., 1999; Pria et al., 2006; Silva et al., 2001; Silveira et al., 2003; Vale et al., 1990; Zerh et al., 1996).

A umidade, considerando a quantidade e duração, é essencial no processo infeccioso para a maioria dos fitopatógenos (Silva et al., 2001). A ocorrência de infecções por *P. aroidearum* na ausência de câmara úmida indica que a umidade advinda dos exsudatos liberados após a realização do ferimento foi suficiente para dar início ao desenvolvimento dos sintomas, facilitando inclusive a penetração da fitobactéria. Silveira et al. (2004) encontraram resultados semelhantes quando inocularam a *Acidovorax citrulli* em melão amarelo. Os resultados obtidos na avaliação da duração da umidade e do início da umidade demonstraram que quanto maior o tempo de exposição das nervuras a câmara úmida, maior foi a severidade. Tais constatações concordam com Moh et al. (2012), os quais afirmaram que as principais condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da podridão mole são alta umidade e temperaturas elevadas.

De forma geral, com base nos resultados encontrados foi possível concluir que as condições que predisõem a ocorrência de severidades mais altas da podridão mole causada por *P. aroidearum* em couve-chinesa são elevada concentração de inóculo do patógeno em conjunto com umidade relativa elevada, próximo a 100% durante 48 h e temperaturas de 32 °C. Segundo o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado para determinação dos

fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento da podridão mole neste patossistema. Além disso, o conhecimento aqui obtido auxiliará o entendimento de epidemias da podridão mole e o desenvolvimento de estratégias eficientes para o manejo da doença.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Mestrado concedida a J. S. Rezende.

Referências

- Barbosa, H.R., & Torres, B.B. (1999). Nutrição e metabolismo bacterianos. In: Trabulsi, L.R., Althertum, F., Gompertz, O.F. & Candeias, N.J.A.N. (3 Ed). *Microbiologia* (pp.25-54). São Paulo. Atheneu.
- Bhat, K. A., Masoodi, S. D., Bhat, N. A., Ahmad, M., Zargar, M. Y., Mir, S. A., & Bhat, M. A. (2010). Studies on the effect of temperature on the development of soft rot of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Journal of Phytology*, 2(2), 64-67.
- Central de Abastecimento de Pernambuco. (2015). Comercialização de produtos. Recife: Central de Abastecimento de Pernambuco. Disponível em: <<http://www.ceasape.org.br/calend.php>>. Acesso em: 07 fevereiro. 2017.
- Davidsson, P. R. R., Kariola, T., Niemi, O., & Palva, T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in Plant Science*.
- De Boer, S. H., Verdonck, L., Vrugink, H., Harju, P., Bangs, H. O., & De Ley, J. (1987). Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 63(6), 487-495.
- Du Raan, S., Coutinho, T. A., & Van der Waals, J. E. (2016). Cardinal temperature differences, determined *in vitro*, between closely related species and subspecies of pectinolytic bacteria responsible for blackleg and soft rot on potatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 144(2),

361-369.

- Farrar, J. J., Nunez, J. J., & Davis, R. M. (2000). Influence of soil saturation and temperature on *Erwinia chrysanthemi* soft rot of carrot. *Plant Disease*, 84(6), 665-668.
- Felix, K. C. S., Silva, C. L., Oliveira, W. J., Mariano, R. L. R., & Souza, E. B. (2017). Calcium-mediated reduction of soft rot disease in Chinese cabbage. *European Journal of Plant Pathology*, 147(1), 73-84.
- Godoy, C., Amorim, L., & Bergamin, A. (1999). Influência da duração do molhamento foliar e da temperatura no desenvolvimento da ferrugem do milho causada por *Puccinia polysora*. *Fitopatologia Brasileira*, 24(2), 160-165.
- Hugouvieux, C. P., N., Condemine, G., Nasser, W., & Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), 213-257.
- Jabuonski, R. E., Reifschneider, F. J. B., & Takatsu, A. (1988). Influência da temperatura no dano causado por *Erwinia* spp. em tubérculos de batateira. *Fitopatologia Brasileira*, 13(4), 317-319.
- Kikumoto, T. (2000). Ecology and biocontrol of soft rot of Chinese cabbage. *Journal of General Plant Pathology*, 66(3), 275-277.
- Madigan, M.T. & Martinko, J.M. (2006). *Brock Biology of Microorganisms*. 11th Ed. London; Pearson Prentice Hall.
- Marcuzzo, L. L., Fernandes, J. M. C., & Becker, W. F. (2009). Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar na severidade da mancha bacteriana do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, 35(3), 229-230.
- Mariano, R. L. R., Silveira, E. B., Alvarado, I. C. M. & Silva, A.M. F. (2005). Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 2,121-153.
- Mello, M. R. F., Silveira, E. B., Viana, I.O., Guerra, M.L., & Mariano, R. L. R. (2011). Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 29(1), 78-83.
- Moh, A. A., Massart, S., Jijakli, M. H., & Lepoivre, P. (2012). Models to predict the combined effects of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium*

- carotovorum* subsp. *carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers. *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 181-191.
- Moraes, A. J. G., Souza, E. B., Mariano, R. L. R., Silva, A. M. F., Lima, N. B., Peixoto, A. R., & Gama, M. A. S. (2016). First Report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing soft rot of *cucurbita pepo* in Brazil. *Plant Disease*, 101(2), 379.
- Moretti, C., Fakhr, R., Cortese, C., De Vos, P., Cerri, M., Geagea, L., & Buonauro, R. (2016). *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Lebanon. *European Journal of Plant Pathology*, 144(1), 205-211.
- Mills, A. A. S., & Hurta, R. A. R. (2006). Sensitivity of *Erwinia* spp. to salt compounds in vitro and their effect on the development of soft rot in potato tubers in storage. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 208-214.
- Nabhan, S., De Boer, S. H., Maiss, E., & Wydra, K. (2013). *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(7), 2520-2525.
- Neto, C. R. B., Gorgati, C. Q., & Pitelli, R. A. (2004). Influência da concentração de inóculo e da idade da planta na intensidade de doença causada por *Fusarium graminearum* em *Egeria densa* e *E. najas*. *Fitopatologia Brasileira*, 29(3), 282-288.
- Oliveira, T. A. S., Blum, L. E. B., Duarte, E. A. A., Tavares, G. M., & Luz, E. D. M. N. (2014). Fatores epidemiológicos de *Phytophthora palmivora* afetando a severidade da podridão-dos-frutos do mamoeiro na pós-colheita. *Summa Phytopathologica*, 40(3), 256-263.
- Pérombelon, M. C. M. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51(1), 1-12.
- Pérombelon, M. C. M., & Kelman, A. (1980). Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 361-387.
- Pria, D. M., Christiano, R. C. S., Furtado, E. L., Amorim, L., & Bergamin Filho, A. (2006). Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. *Plant Pathology*, 55(5), 657-663.

- Raju, M. R. B., Pal, V., & Jalali, I. (2008). Inoculation method of *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* and factors influencing development of bacterial soft rot in Radish. *Journal of Mycology Plant Pathology*, 38(2), 311-315.
- Ren, J., Petzoldt, R., & Dickson, M. H. (2001). Genetics and population improvement of resistance to bacterial soft rot in chinese cabbage. *Euphytica*, 117(3), 197-207.
- Seo, S. T., Koo, J. H., Hur, J. H., & Lim, C. K. (2004). Characterization of Korean *Erwinia carotovora* strains from potato and chinese cabbage. *The Plant Pathology Journal*, 20(4), 283-288.
- Senhor, R. F., Câmara, M. P. S., Prichoa, L. D. F., Lima, M. B., Sales JR, R., & Michereff, S. J. (2008). Influência do método de inoculação, intensidade do ferimento e idade do fruto na severidade da podridão-de-cratera em melão. *Summa Phytopathologica*, 34(3), 232-237.
- Silva, S.R., Rios, G.P., & Silva, S.C. (2001). Influência da resistência e do período de molhamento na infecção e desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 26(4), 726-73.
- Silva, W. A. D. (2016). Caracterização epidemiológica da podridão em escama da cebola. 50f. (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Silva A. M. F., Mariano R. L. R., Michereff S. J., Silveira E. B., & Medeiros F. H. V. (2007). Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface e couve-chinesa em Pernambuco. *Caatinga*, 20(2), 84-93.
- Silveira, E. B., Mariano, R. L. R., & Michereff, S. J. (2004). Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. *Fitopatologia Brasileira*, 29(1), 36.
- Silveira, E. B., Michereff, S. J., & Mariano, R. L. R. (2003). Severidade da Mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Fitopatologia Brasileira*, 28(2), 171-175.
- Vale, F. X. R., Jesus JR. W. C., & Zambolim, L. (2004). Natureza das epidemias. In: Vale, F. X. R.; Jesus Jr., W.C.; Zambolim, L. (Eds.). *Epidemiologia Aplicada ao Manejo de Doenças de Plantas*. Belo Horizonte.
- Vale, F. X. R., Zambolim, L., & Chaves, G. M. (1990). Efeito do binômio temperatura-duração do

molhamento foliar sobre a infecção por *Phakopsora pachyrhizi* em soja. *Fitopatologia Brasileira*, 15(3), 200-202.

Zambolim, L., Jesus Junior, W.C., & Rodrigues, F. A. (2014). *O Essencial da fitopatologia-Epidemiologia de Doenças de Plantas*. 1.ed. v.2 Viçosa: Imprensa Universitária de UFV.

Zehr, E. I., Shepard, D. P., & Bridges Jr, W. C. (1996). Bacterial spot of peach as influenced by water congestion, leaf wetness duration, and temperature. *Plant Disease*, 80(3), 339-341.

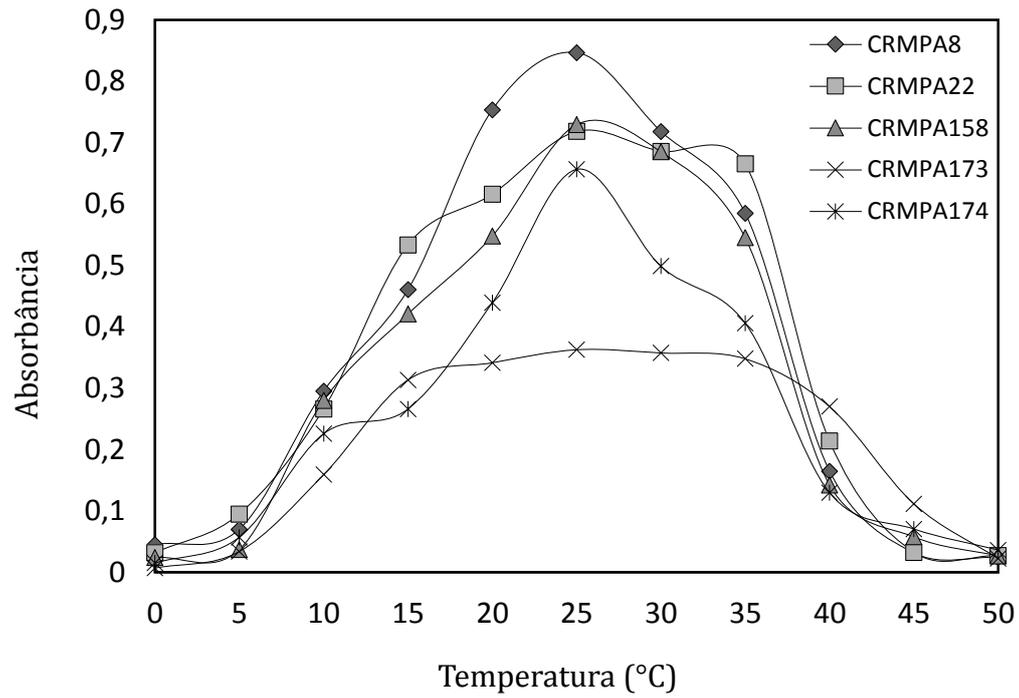


Figura 1. Curva de crescimento *in vitro* dos isolados CRMPA8, CRMPA22, CRMPA158, CRMPA173 E CRMPA174 de *Pectobacterium aroidearum* em meio de cultura líquido (NYD).

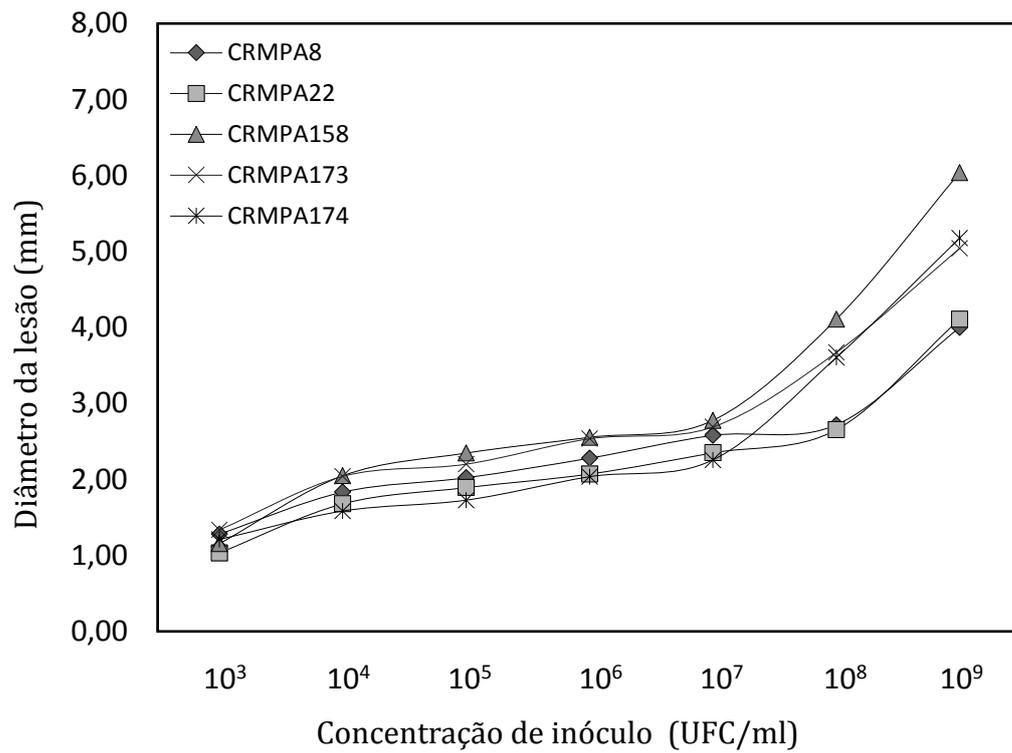


Figura 2. Efeito da concentração de inóculo na severidade (diâmetro da lesão) dos isolados CRMPA8, CRMPA22, CRMPA158, CRMPA173 E CRMPA174 de *Pectobacterium aroidearum* em nervuras destacadas de couve-chines.

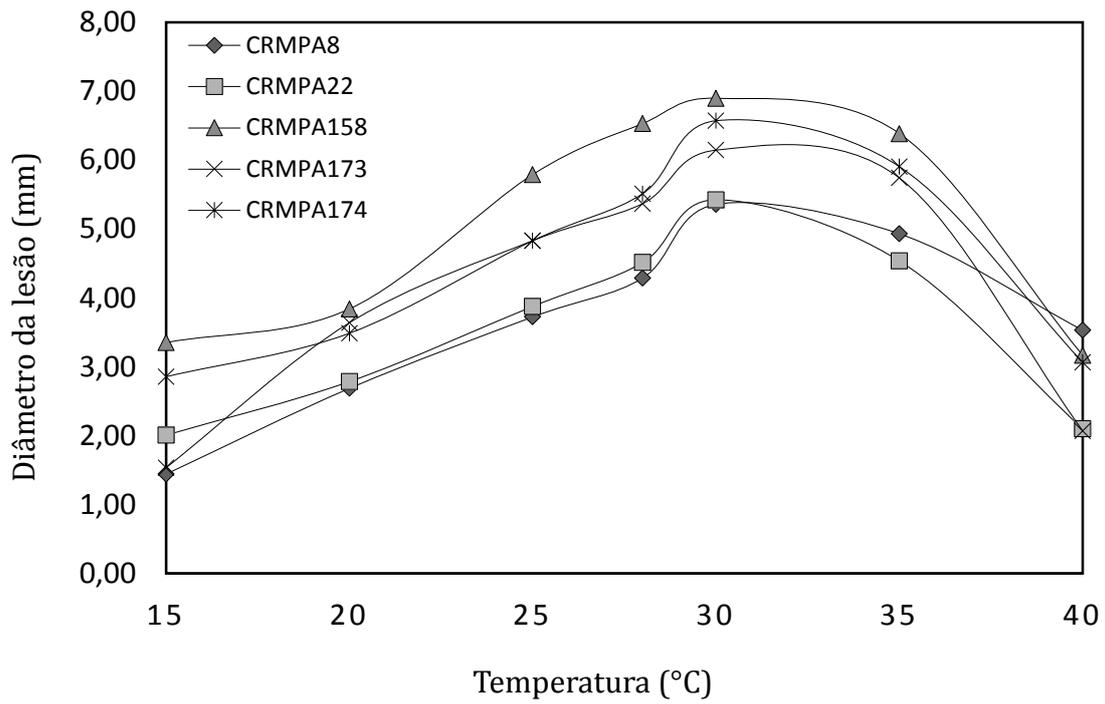


Figura 3. Efeito da temperatura na severidade (diâmetro da lesão) dos isolados CRMPA8, CRMPA22, CRMPA158, CRMPA173 E CRMPA174 de *Pectobacterium aroidearum* em nervuras destacadas de couve-chines.

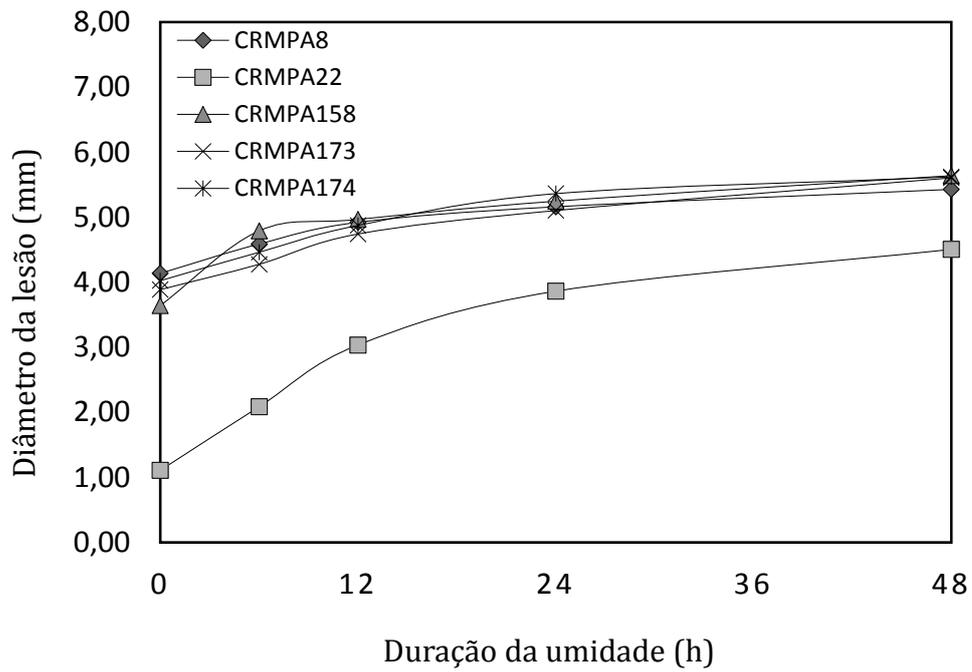


Figura 4. Efeito da duração da umidade elevada na severidade (diâmetro da lesão) dos isolados CRMPA8, CRMPA22, CRMPA158, CRMPA173 E CRMPA174 de *Pectobacterium aroidearum* em nervuras destacadas de couve-chines.

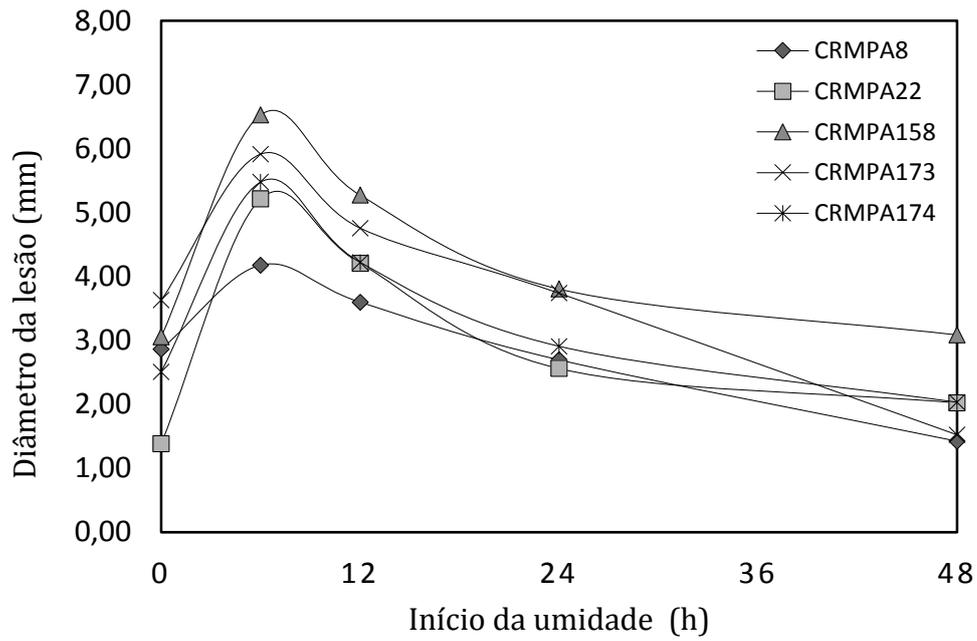


Figura 5. Efeito do início da umidade elevada na severidade (diâmetro da lesão) dos isolados CRMPA8, CRMPA22, CRMPA158, CRMPA173 E CRMPA174 de *Pectobacterium aroidearum* em nervuras destacadas de couve-chines.

Tabela 1. Tamanho mínimo da lesão (Y_{min}), tamanho máximo da lesão (Y_{max}) e área abaixo da curva de progresso da lesão em função da concentração do inóculo (AACCI), estimada para isolados de *Pectobacterium aroidearum* inoculados com concentrações de 1×10^3 a 1×10^9 UFC/mL em nervuras destacadas de couve-chinesa

Isolado	Y_{min} (mm) ¹	Y_{max} (mm) ¹	AACCI
CRMPA8	1,3 a	4,0 c	13,9 cd
CRMPA22	1,1 a	4,0 c	12,9 d
CRMPA158	1,1 a	6,1 a	17,3 a
CRMPA173	1,3 a	5,0 b	16,3 b
CRMPA174	1,2 a	5,2 b	14,3 c

¹ Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão polinomial de quatro grau: $y = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4$, em que y = diâmetro da lesão (mm); a , b , c , d e e são parâmetros da regressão; x = concentração de inóculo.

² Dados são a média de oito repetições por isolado, considerando quatro repetições por isolado e duas replicações do experimento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$).

Tabela 2. Temperatura ótima (Topt), tamanho mínimo da lesão (Ymin), tamanho máximo da lesão (Ymax) e área abaixo da curva de progresso da lesão em função da temperatura (AACTE), determinadas para isolados de *Pectobacterium aroidearum* inoculados em nervuras destacadas de couve-chinesa mantidas em temperaturas entre 15 e 40 °C

Isolado	Topt (°C) ¹	Ymin (mm) ¹	Ymax (mm) ¹	AACTE
CRMPA8	33,0 a	1,5 b	5,2 c	95,7 c
CRMPA22	31,7 bc	1,8 b	5,1 c	94,1 c
CRMPA158	31,7 bc	3,1 a	7,0 a	133,2 a
CRMPA173	31,1 c	1,5 b	6,1 b	110,6 b
CRMPA174	32,1 b	2,7 a	6,4 ab	119,1 b

¹ Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão polinomial cúbica: $y=a+bx+cx^2+dx^3$, em que y = diâmetro da lesão (mm); a , b , c e d são parâmetros da regressão; x = temperatura

²Dados são a média de oito repetições por isolado, considerando quatro repetições por isolado e duas replicações do experimento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$)

Tabela 3. Tempo de duração da umidade elevada para que a lesão atinja a metade do tamanho máximo (DU_{met}), tamanho mínimo da lesão (Y_{min}), tamanho máximo da lesão (Y_{max}) e área abaixo da curva de progresso da lesão em função do tempo de duração da umidade elevada (AACDU), determinados para isolados de *Pectobacterium aroidearum* inoculados em nervuras destacadas de couve-chinesa mantidas em câmara umida entre 0 e 48 horas após a inoculação

Isolado	DU _{met} (h) ¹	Y _{min} (mm) ¹	Y _{max} (mm) ¹	AACDU
CRMPA8	11,5 ab ²	4,2 a	5,4 a	243,5 a
CRMPA22	8,2 cd	1,2 b	4,4 b	170,9 b
CRMPA158	6,3 d	3,7 a	5,5 a	248,8 a
CRMPA173	13,5 a	3,9 a	5,6 a	240,7 a
CRMPA174	9,7 bc	4,0 a	5,6 a	247,7 a

¹ Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão não linear sigmoide com três parâmetros: $y = a/(1 + \exp(-(x - b/c)))$, em que y = diâmetro da lesão (mm); a , b e c são parâmetros da regressão; x = tempo de duração da umidade elevada

² Dados são a média de oito repetições por isolado, considerando quatro repetições por isolado e duas replicações do experimento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$).

Tabela 4. Tempo de início da umidade elevada para que a lesão atinja o tamanho máximo (IUopt) e a metade do tamanho máximo (IUm_{et}), tamanho máximo da lesão (Y_{max}), tamanho mínimo da lesão (Y_{min}) e área abaixo da curva de progresso da lesão em função do início de umidade relativa elevada (AACIU), induzido por isolados de *Pectobacterium aroidearum* inoculados em nervuras destacadas de couve-chinesa mantidas em câmara úmida entre 0 e 48 horas após a inoculação

Isolado	IUopt (h) ¹	IUm _{et} (h) ¹	Y _{min} (mm) ¹	Y _{max} (mm) ¹	AACIU ¹
CRMPA8	6,7 a	3,0 b	1,5 c	4,1 c	129,3 d
CRMPA22	5,9 a	3,5 ab	1,8 bc	5,2 b	140,7 cd
CRMPA158	5,4 a	3,6 ab	3,0 a	6,6 a	199,2 a
CRMPA173	6,8 a	4,6 a	1,6 c	5,5 b	160,7 b
CRMPA174	5,3 a	3,3 b	2,1 b	5,5 b	154,2 bc

¹ Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão não linear pico de pulso: $y = 4a \exp((-x-b)/c) / (1 - \exp(-(x-b)/c))$, em que y = diâmetro da lesão (mm); a , b e c são parâmetros da regressão; x = tempo de início da umidade elevada

² Dados são a média de oito repetições por isolado, considerando quatro repetições por isolado e duas replicações do experimento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ($P=0,05$)

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A temperatura média ideal para cultivo dos isolados de *P. aroidearum in vitro* foi 24,5 °C ;

- ✓ A severidade da podridão mole em couve-chinesa foi mais alta quando a concentração de inóculo dos isolados de *P. aroidearum* foi de 10⁹ UFC/mL;

- ✓ A podridão mole causada por *P. aroidearum* apresentou severidade mais elevada a 32 °C;

- ✓ O tratamento com umidade elevada durante 48 h proporcionou maior severidade da doença;

- ✓ O tratamento com umidade elevada com início as 6 h após as inoculações proporcionou maior severidade da podridão mole, comprovando que o início da umidade elevada não foi um fator determinante para o aumento da severidade da doença.