

MARCELO RODRIGUES FIGUEIRA DE MELLO

**EFICIÊNCIA DE INDUTORES E ANTIBIÓTICOS NO CONTROLE DA
PODRIDÃO-MOLE EM COUVE-CHINESA**

**RECIFE – PE
FEVEREIRO, 2009**

**EFICIÊNCIA DE INDUTORES E ANTIBIÓTICOS NO CONTROLE DA
PODRIDÃO-MOLE EM COUVE-CHINESA**

MARCELO RODRIGUES FIGUEIRA DE MELLO

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Fitopatologia**

**RECIFE – PE
FEVEREIRO, 2009**

Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

M255e Mello, Marcelo Rodrigues Figueira
Eficiência de indutores e antibióticos no controle da
podridão-mole em couve-chinesa / Marcelo Rodrigues Figueira
de Mello – Recife EDUFRPE, 2009.
100 f. : il.

Orientador: Rosa de Lima Ramos Mariano
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui bibliografia e anexo.

CDD 632.32

1. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
2. *Brassica pekinensis*
3. Indução de resistência
4. Peroxidase
5. Polifenoloxidase
6. *Saccharomyces cerevisiae*
7. *Rhodotorula sp.*
8. Oxitetraciclina
9. Estreptomicina
- I. Título

**EFICIÊNCIA DE INDUTORES E ANTIBIÓTICOS NO CONTROLE DA
PODRIDÃO-MOLE EM COUVE-CHINESA**

MARCELO RODRIGUES FIGUEIRA DE MELLO

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Professora Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano - Orientadora

Professora Dra. Elineide Barbosa da Silveira - Co-orientadora

Professor Dr. Rildo Sartori Barbosa Coelho - Co-orientador

**RECIFE – PE
FEVEREIRO, 2009**

**Eficiência de indutores e antibióticos no controle da podridão-
mole em couve-chinesa**

MARCELO RODRIGUES FIGUEIRA DE MELLO

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 16/02/2009.

ORIENTADORA:

Prof.^a Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano

EXAMINADORES:

Prof.^a Dra. Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

Dra. Luciana Melo Sartori Gurgel (IPA-PE)

Dr. Ailton Reis (EMBRAPA-HORTALIÇAS)

Prof.^a Dra. Neilza Reis Castro (UFRPE)

**RECIFE – PE
FEVEREIRO, 2009**

"Uma chave importante para o sucesso
é a auto-confiança. Uma chave
importante para a auto-confiança é a **preparação.**"
(Arthur Ashe)

"Consulte não a seus medos, mas a suas
esperanças e sonhos. Pense não sobre suas
frustrações, mas sobre seu potencial não usado.

Preocupe-se não com o que você tentou e
falhou, mas com aquilo que ainda é **possível** a
você fazer."

(Papa João XXIII)

Não confunda jamais conhecimento com
sabedoria. Um o ajuda a ganhar a vida;
o outro a **construir uma vida.**"
(Sandra Carey)

Ao meu pai, **Paulo Roberto Figueira de Mello** minha eterna gratidão pelos ensinamentos e por orientar minha conduta de vida sempre pautada na generosidade e decência.

OFEREÇO

A minha mãe **Nair Rodrigues Figueira de Mello**, pelo amor, carinho, dedicação e paciência, sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida e força suprema nos momentos difíceis desta minha caminhada;

À Professora **Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano**, pela orientação acadêmica, que muito contribuiu para minha formação profissional, empenho, atenção, dedicação, amizade e, sobretudo, *paciência franciscana nesses mais de 10 anos de convivência*.

Ao **Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)**, pela oportunidade de realização dos cursos de Graduação, Mestrado e Doutorado/Fitopatologia;

Ao **Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia e aos Membros do Conselho de Coordenação Didática (CCD)**, pela confiança e apoio em mim depositados;

Aos **professores que compõem o Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)**, pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso, em especial, o professor *Rildo Sartori*, no qual seus ensinamentos inspiraram o tema da minha tese;

À **Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelas concessões de bolsas de estudo;

Ao **Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA**, em especial ao escritório local de Camocim de São Félix – Gerência Regional Caruaru;

Aos senhores *Sebastião da Silva* e *Félix Peixoto* **Agricultores Familiares** que cederam a área para realização dos experimentos em campo no Município de Camocim de São Félix;

Meu eterno agradecimento à *Ivanise Viana*, pequena galega dos olhos azuis, que com sua amizade, dedicação e principalmente equilíbrio, colaborou de forma decisiva em todos os momentos desse trabalho;

A “estagiária” e futura mestre, *Kedma*, ao meticoloso *Marco Aurélio* e a caprichosa *Myrzânia* pela colaboração em etapas primordiais dos experimentos;

As meus **colegas de Laboratório**, *Alessandra*, *Kátia*, *Kirley*, *Aldenir*, *André* e *Clêidio* pela amizade nos momentos difíceis e por me ouvirem, mesmo que forçadamente, nos momentos de estresses;

A todos os colegas de turma, *Giltemberg*, *Paula*, *Valéria*, *Zilderlândia*, *Wagner* e em especial *Adriano*, meu grande guru acadêmico em momentos importantes.

Aos **eternos colegas de mestrado**, a dengosa *Sandra Maranhão* e o metódico *Paulo Henrique Sampaio*;

A *Castrinho*, por tudo, *Edymota*, pela paz e harmonia transmitidas e a *Val Val*, o equilíbrio que me faltava;

À *Darcy Martins*, *Romildo Angeiras* e *Adriana Melo*, pela amizade e presteza, ao longo do curso;

A *Luiz Coelho (Lula)* e a *Sr. Luís* pelo apoio na realização dos trabalhos executados em casa de vegetação;

Finalmente, a todos que de uma forma ou de outra, participaram de todos os momentos vividos nessa *longa, árdua, porém prazerosa* jornada, minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	vi
SUMÁRIO	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
Capítulo I – Introdução Geral	14
Referências Bibliográficas	36
Capítulo II - Efeito de indutores de resistência no controle da podridão-mole em couve-chinesa	56
Resumo	56
Abstract	57
Introdução	58
Material e Métodos	60
Resultado e Discussão.....	64
Referências Bibliográficas	69
Capítulo III - Efeito de antibióticos e leveduras no controle da podridão-mole em couve-chinesa	77
Resumo	77
Abstract	78
Introdução	79
Material e Métodos	80
Resultado e Discussão.....	86
Referências Bibliográficas	91
CONCLUSÕES GERAIS	99

RESUMO

A produção de couve-chinesa (*Brassica pekinensis*) pode ser limitada pela ocorrência de doenças, dentre as quais se destaca a podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc). O efeito de indutores e antibióticos no controle desta doença foi estudado em laboratório, casa de vegetação e campo. No primeiro trabalho, foram testados acibenzolar-S-metil (ASM) (0,025 g/L), Ecolife[®] (2 mL/L), Agro-Mos[®] (2 mL/L) e óxido de cálcio (0,22 g/L). Foram avaliados, a inibição do crescimento bacteriano “in vitro”; os componentes epidemiológicos, incidência (INC), período de incubação (PI), severidade final da doença (SEVF), índice de doença (IDO) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD); a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase e o custo fisiológico da indução. Em casa de vegetação e campo os indutores foram pulverizados sete dias após o transplante e sete dias após a indução, o isolado Pcc120 foi inoculado por picada, exceto nos experimentos de atividade enzimática e custo fisiológico. Pcc120 não foi inibido “in vitro” por nenhum dos produtos testados. Não houve redução da INC em nenhum dos experimentos. Em casa de vegetação, a SEVF da doença foi reduzida em 47,5% pelos tratamentos Agro-Mos[®] e ASM, os quais também, respectivamente, reduziram o IDO em 35,1% e 45,3% e propiciaram as menores AACPD. A resistência induzida foi evidenciada pela ausência de antibiose dos dois produtos contra Pcc e pelo aumento das atividades da peroxidase e polifenoloxidase. Em campo, apenas o ASM confirmou os resultados de casa de vegetação reduzindo a intensidade da doença. Não houve custo fisiológico para as plantas com aplicação do ASM ou Agro-Mos[®]. No segundo trabalho avaliou-se a sensibilidade “in vitro” de Pcc a bactericidas, o efeito de Mycoshield[®] (oxitetraciclina 20%) nas dosagens de 3,0 e 1,5 g/L, e das leveduras (Rh1 e Rh2 - *Rhodotorula* spp. e Sc1 - *Saccharomyces cerevisiae* a 10⁸ cel/mL) no controle da doença em casa de vegetação e em campo. As plantas foram pulverizadas com Mycoshield[®] e leveduras sete dias após o transplante, e inoculadas sete dias e 12 h após o tratamento, respectivamente. Foram avaliados INC, PI, SEVF,

IDO e AACPD. In vitro, 40 isolados de Pcc testados apresentaram resistência ao sulfato de cobre e sensibilidade a oxitetraciclina, estreptomicina, oxitetraciclina+estreptomicina e oxitetraciclina+sulfato de cobre, todos na concentração de 0,2 g/L. Seis isolados de Pcc foram significativamente mais inibidos por Mycoshield[®] do que por Agri-Micina[®] (oxitetraciclina 1,5% + estreptomicina 15%), não sendo inibidos por Kasumin[®] (casugamicina 2%). Em casa de vegetação, o Mycoshield[®] na dosagem 3,0 g/L reduziu a SEVF e o IDO em até 47,4 e 19%; já a levedura Sc1 reduziu a SEVF e a AACPD em até 27,6 e 39,3%, respectivamente, enquanto Rh1 reduziu a AACPD em até 33,5. Em campo, o Mycoshield[®] reduziu o IDO, a SEVF e a AACPD em respectivamente 14,4; 15,5 e 28,9%; enquanto que Rh1 reduziu o IDO em 8,8% e Sc1 reduziu a AACPD em 15,7%. A redução da intensidade da doença e o baixo custo fisiológico da indução indicam a potencialidade do uso do ASM em um programa de manejo integrado da podridão-mole em couve-chinesa. No entanto, o Mycoshield[®] e as leveduras apresentaram baixa eficiência para o controle da doença em campo.

Palavras-chave: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Brassica pekinensis*, indução de resistência, peroxidase, polifenoloxidase, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp., oxitetraciclina, estreptomicina.

ABSTRACT

The production of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) may be limited by occurrence of diseases, among which the soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc). The effect of inducers and antibiotics on the disease control was studied in laboratory, greenhouse and field. In the first paper acibenzolar-S-metil (ASM) (0.025 g L^{-1}), Ecolife[®] (2 mL L^{-1}), Agro-Mos[®] (2 mL L^{-1}) and calcium oxide (0.22 g L^{-1}) were evaluated for *in vitro* bacterial growth inhibition; epidemiological components, incidence (INC), incubation period (PI), disease final severity (SEVF), disease index (IDO) and area under disease curve progress (AUPDC); enzymatic activity of peroxidase and polyphenoloxidase and physiological cost of induction. Under greenhouse and field conditions inducers were sprayed seven days after transplant, and seven days after induction strain Pcc120 was inoculated by pricking, except for enzymatic activity and physiological cost experiments. *In vitro* Pcc120 was not inhibited by any tested product. The INC was not reduced in any experiment. In greenhouse SEVF was reduced by 47.5% by Agro-Mos[®] and ASM which also reduced IDO by 35.1 and 45.3% respectively and AUDCP. Induced resistance was confirmed by negative antibiosis against pathogen and increase of peroxidase and polyphenoloxidase activities in treated plants. In field only ASM confirmed greenhouse results by reducing disease intensity. There was no physiological cost for plants sprayed with ASM or Agro-Mos[®]. In the second paper it was evaluated the *in vitro* sensibility of Pcc to bactericides, and the effect of Mycoshield[®] (oxitetracycline 20%) at 3.0 and 1.5 g L^{-1} , and yeasts (Rh1 and Rh2 - *Rhodotorula* spp. and Sc1 - *Saccharomyces cerevisiae* at 10^8 cel mL^{-1}) to control the disease in greenhouse and field. Plants were sprayed with Mycoshield[®] and yeasts seven days after transplant and inoculated seven days and 12 h after treatment, respectively. In all experiments INC, PI, SEVF, IDO and AUDPC were evaluated. *In vitro* 40 Pcc isolates were resistant to copper sulfate and sensitive to oxitetracycline, streptomycin, oxitetracycline

+ streptomycin and oxitetracycline + copper sulfate all at 0.2 g L⁻¹. Six Pcc isolates were significantly more inhibited by Mycoshield[®] than by Agri-Micina[®] (oxitetracycline 1.5% + streptomycin 15%), but there was no inhibition by Kasumin[®] (kasugamicin 2%). In greenhouse Mycoshield[®] at 3.0 g L⁻¹ reduced SEVF and IDO until 47.4 and 19.0%. The yeast Sc1 reduced SEVF and AUDCP till 27.6 and 39.3% respectively, while Rh1 reduced AUDCP until 33.5%. In field Mycoshield[®] reduced IDO, SEVF and AUDCP by 14.4; 15.5 and 28.9% respectively; while Rh1 reduced IDO by 8.8% and Sc1 diminished the AUDCP by 15.7%. The reduction of disease intensity and low physiological cost of induction indicate the potentiality of ASM in an integrate management program of Chinese cabbage soft rot. On the other hand Mycoshield[®] and yeasts showed low efficiency for controlling disease in field.

Keywords: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Brassica pekinensis*, induction of resistance, peroxidase, polyphenoloxidase, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp., oxitetracycline, streptomycin.



Capítulo I

Introdução Geral

Eficiência de indutores e antibióticos no controle da podridão-mole em couve-chinesa

INTRODUÇÃO

1- A couve-chinesa

O segmento familiar da agropecuária brasileira respondeu em 2003 por 10,1% do PIB brasileiro, comparado ao agronegócio nacional que foi responsável, nesse ano, por 30,6% (GUILHOTO et al., 2006). Já a produção de hortaliças no Brasil em 2007 foi de 17,24 toneladas, cultivadas em 800 mil hectares, representando cerca de 3,5% do PIB agrícola (CAMARGO, 2008) e gerando de três a seis empregos diretos e indiretos. O estado de Pernambuco é responsável por 27% da produção nordestina de olerícolas, perdendo apenas para a Bahia e Ceará, com 38% e 28%, respectivamente. As folhosas ocupam lugar de destaque na olericultura pernambucana, chegando a responder por 37% do valor total gerado pelas olerícolas no estado (IBGE, 2006). Esses dados evidenciam a importância da agricultura familiar e da produção de hortaliças na geração de emprego e renda (AGRIANUAL, 2004).

O cultivo de brássicas tem destacada importância na olericultura brasileira, devido ao grande volume de produção, retorno econômico e valor nutricional. As espécies pertencentes à família Brassicaceae (Cruciferae) apresentam diversas variedades botânicas utilizadas na alimentação humana. No Brasil, entre as mais cultivadas, destacam-se a *Brassica oleraceae* var. *italica* L. (brócolis), *Brassica pekinensis* L. (couve-chinesa), *Brassica oleraceae* var. *botrytis* L. (couve-flor), *B. oleracea* var. *acephala* L. (couve-manteiga) e *Brassica oleraceae* var. *capitata* L. (repolho) (FILGUEIRA, 2000).

Cultivada na China há mais de 1.500 anos, a couve-chinesa foi introduzida no Japão no final do século XIX, sendo tradicionalmente apreciada pela culinária nipônica

(MAROTO-BORREGO, 1995). É erroneamente chamada de “acelga”, folhosa que pertence à família das Chenopodiáceas, denominada *Beta vulgaris* L. var. *cycla*, a qual também apresenta uma nervura central destacada e de coloração branca. A couve-chinesa é uma planta anual, de folhas oblongas, quase inteiras, crispadas e onduladas nas margens, pilosas e com comprimento de 30 a 40 cm. Apresenta limbo de coloração verde pálido, com nervura central branca, carnosa e grossa. As folhas se fecham formando uma cabeça compacta, globular-alongada (FILGUEIRA, 2000).

A maioria das cultivares de couve-chinesa produz melhor sob temperaturas amenas, ou seja, quando semeadas no outono-inverno. Entretanto, híbridos a exemplo de ‘Shonan’ e ‘Komachi’ estão sendo introduzidos no Brasil, por apresentarem maior tolerância ao calor (FILGUEIRA, 2000). De acordo com Maroto-Borrego (1995), a couve-chinesa também é sensível a fotoperíodos longos e a temperaturas inferiores a 12 °C, que induzem a floração prematura. É semeada em bandeja ou em sementeira e as mudas são posteriormente transplantadas para o local definitivo, com espaçamento de 70 × 30 cm. As cabeças são colhidas 60-70 dias após a semeadura e embaladas em sacos de malhas plásticas para o transporte até os centros de comercialização (FILGUEIRA, 2000).

Existe um déficit de informações atualizadas sobre a produção de brássicas no Brasil, segundo a FAO, mundialmente, a área colhida em 2007 foi de 2.292.097 ha, com produção total de 49.205.018 t (FAO, 2007). No Brasil, a produção de couve-chinesa em 1996 atingiu 4.509.258 t, sendo a região Nordeste responsável por 149.772 t e Pernambuco 111.838 t, com destaque especial para a mesoregião agreste com 56.388 t (IBGE, 1996). Segundo a Central de Abastecimento de Pernambuco (CEAGEPE), os principais Municípios produtores de couve-chinesa no estado são Camocim de São Félix (45%) e Vitória de Santo Antão (43%), seguidos em menor escala por Chã Grande, Garanhuns, Bonito, São Joaquim do Monte e Gravatá (12%). A safra da couve-chinesa em

Pernambuco ocorre de janeiro a maio, onde existe uma oferta de produtos de melhor qualidade e, por conseguinte preços mais baixos (CEASA-PE, 2008). A busca por preços melhores faz com que parte dos agricultores cultive a couve-chinesa no inverno, época favorável à ocorrência de doenças.

Assim como outras culturas olerícolas, a couve-chinesa pode ser afetada por diferentes pragas e doenças dentre as quais se destacam a lagarta-rosca (*Agrotis ipisilon* Hufnagel), a traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella* L.), a mancha-de-Alternária (*Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltsh., a hérnia das crucíferas (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) e a podridão-mole (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al. e *Pectobacterium atrosepticum* (Van Hall) Gardan et al). Esta última é mencionada como a mais destrutiva e importante doença em muitas áreas produtoras no Brasil e no mundo (MEW et al., 1976; MESSIAEN et al., 1995; MALAVOLTA JR et al., 1998; KIKUMOTO, 2000; KYEREMEH et al., 2000; REN et al., 2001; TOGASHI et al., 2001; SEO; TAKANAMI, 2002).

No Nordeste, a couve-chinesa é cultivada predominantemente em áreas medindo menos que cinco hectares, exploração típica de pequenos agricultores (IBGE, 1996). Em 2004, na mesorregião Agreste do Estado de Pernambuco, foi constatada prevalência de 100% da podridão-mole em todas as áreas produtoras amostradas, com incidência variando de 1 a 67% (SILVA, 2005).

A podridão-mole em couve-chinesa pode reduzir significativamente a produção no campo, ocorrendo também nas fases de pós-colheita, armazenamento e transporte (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). As perdas econômicas causadas por esta doença são grandes, variando com o valor da cultura, severidade do ataque, condições ambientais, subespécies envolvidas, condições de cultivo, armazenamento, transporte e

comercialização dos produtos (JABUONSKY et al., 1988; PÉROMBELON; KELMAN, 1980).

2- A podridão-mole

Em couve-chinesa, os sintomas da podridão-mole se iniciam na base e nervura das folhas que ficam em contato com o solo quando a planta está no final do ciclo, formando a cabeça e próximo à colheita (KIKUMOTO, 2000). A maceração dos tecidos progride rapidamente para o caule principal, resultando no colapso e morte de toda a planta (REN et al., 2001).

As bactérias que produzem enzimas pectinolíticas responsáveis pelo sintoma de podridão mole, comumente denominadas pectobactérias, penetram nos tecidos da planta através de ferimentos e causam inicialmente encharcamento ou anasarca (MARINGONI, 1997). Essas bactérias dependem em grande parte da temperatura e concentração de oxigênio, para iniciar a infecção, bem como para a produção e intensidade dos sintomas (HAYWARD; MARIANO, 1997; PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Em condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da doença, incluindo água livre, baixa concentração de oxigênio e temperatura elevada, elas colonizam o tecido vascular e os espaços intercelulares. (PÉROMBELON; KELMAN, 1980; TOTH et al., 2003).

As duas espécies de *Pectobacterium* economicamente mais importantes, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. atrosepticum*, causam podridão-mole em vários hospedeiros, entre os quais, alface (*Lactuca sativa* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), beterraba (*Beta vulgaris* L.), cenoura (*Daucus carota* L.), couve-chinesa, pimentão (*Capsicum annuum* L.), rabanete (*Brassica rapa* L.), repolho e tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (PÉROMBELON, 2002; SEO; TAKANAMI, 2002; TOTH et al., 2003) em diferentes regiões (PÉROMBELON; KELMAN, 1980; PÉROMBELON, 2002; TOTH

et al., 2003). As bactérias que causam podridão-mole em couve-chinesa pertencem à espécie *P. carotovorum* (Jones) Hauben et al. com predominância da subespécie *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (MEW et al., 1976; REN et al., 2001), apesar de *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois et al.) Hauben et al. (SEO et al., 2004) e *P. atrosepticum* (DE BOER et al., 1987) já terem sido relatadas nesta hospedeira.

Isolados de *Pectobacterium* são anaeróbicos facultativos, quimiorganotróficos, Gram negativos e móveis por flagelos peritríquios. Têm crescimento ótimo entre 28-30 °C, todas as espécies são oxidase negativas e catalase positivas, embora muitas espécies não reduzam nitratos. Fermentam glucose, produzem β-galactosidase e H₂S, utilizam L-arabinose, D-galactose, D-glucose, glicerol, D-manose, D-ribose e sucrose, mas não produzem urease ou ácido a partir de adonitol. O cultivo desses isolados em meio caseína ácida-peptona-glicose (CPG) com incubação a 24 °C por 48 h, permite a visualização em lupa, sob iluminação oblíqua, de colônias jovens de pectobactérias com aspecto de “vidro quebrado”. Esta característica também distingue as colônias de *Pectobacterium* de *Pseudomonas* spp. e de outras bactérias presentes no solo (KELMAN; DICKEY, 1995). Outros testes como crescimento a 37 °C, redução de sacarose, utilização de ceto-metilglucosídeo, produção de ácido a partir de sorbitol, melibiose, citrato, arabitól, rafinose e lactose, sensibilidade a eritromicina e produção de indol permitem a separação das principais pectobactérias (DE BOER; KELMAN, 2001). Além destes, a determinação da atividade pectinolítica em meio CVP (cristal violeta pectato) é um critério auxiliar. Neste meio, após incubação por 48 horas, isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* formam depressões a 27 e 33,5 °C mas não a 37 °C; *P. atrosepticum* forma depressões apenas a 27 °C e *D. chrysanthemi* (Burkholder et al.) Samson et al. (sin. *P. chrysanthemi* (Burkholder et al.) Brenner et al.) formam depressões a 27, 33,5 e 37 °C (HYMAN et al.,

2002). A biologia molecular, biotecnologia e identificação por ácidos graxos surgem também como estratégias importantes na detecção de *P. carotovorum*.

As bactérias causadoras de podridões moles produzem grandes quantidades de enzimas pectinolíticas ou pectinases que degradam tecidos parenquimatosos em vários hospedeiros, principalmente dicotiledôneas de ciclos curtos ou anuais, com tecidos pouco lignificados. Os quatro principais tipos de enzimas pectinolíticas produzidas por *Pectobacterium* são: pectato liase (Pel), pectina liase (Pnl), pectina metil esterase (Pme) e poligalacturonase (Peh). As três primeiras têm pH ótimo em torno de 8,0 e a última em torno de 6,0. Além das enzimas pectinolíticas, proteases, celulasas e xilases também estão envolvidas na patogenicidade destas bactérias (HAYWARD; MARIANO, 1997).

Pectobacterium carotovorum é capaz de sobreviver como epífita na filosfera de plantas hospedeiras, como saprófita no solo, em restos culturais infectados, em material de plantio, em associação com ervas daninhas ou na rizosfera de plantas cultivadas, sendo essas as principais fontes de inóculo primário desta bactéria. Dissemina-se facilmente pela água, raízes e tubérculos infectados, insetos, tratos culturais, homem e implementos agrícolas (PÉROMBELON; KELMAN, 1980; GOTO, 1992).

Para controle da doença recomenda-se o uso de variedades resistentes (REN et al., 2001) ou plantas transgênicas (FRAY et al., 1999; MÃE et al., 2001), controle biológico (DONG et al., 2004; MANEFIELD et al., 2001), uso de cálcio (FLEGO et al., 1997), indutores de resistência (BENELLI et al., 2004) e emprego de antibióticos ou fungicidas cúpricos (ZAMBOLIM et al., 1997).

No entanto, Ren et al. (2001) consideram que o controle da podridão-mole é dificultado pela ampla gama de plantas hospedeiras e pela sobrevivência de *Pectobacterium* em restos de cultura no solo. O controle químico não é eficiente, mas as práticas culturais permitem reduzir a incidência da doença. Maringoni (1997) salienta que

para as Brassicaceae é importante evitar ferimentos durante os tratamentos culturais, utilizar adubação equilibrada com nitrogênio e boro, controlar insetos e fazer programas de rotação de culturas, especialmente com gramíneas.

3- Indução de Resistência

A indução de resistência é uma proposta promissora no controle de várias doenças, podendo ser efetiva contra diversos patógenos, incluindo vírus, bactérias, nematóides e fungos (BONALDO et al., 2005). Representa um método de controle alternativo, que juntamente com outros, dentro de um programa de manejo, pode evitar ou atrasar a entrada ou a subsequente atividade do patógeno nos tecidos das plantas. (RESENDE et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2006). Consiste no tratamento com agentes bióticos ou abióticos, ativando mecanismos de defesa da planta ou parte desta contra o ataque de patógenos (AGRIOS, 2005; BONALDO et al., 2005). Trata-se de uma interação extremamente específica, regulada entre os genes de avirulência do patógeno e o gene guarda da planta, ativando sinais responsáveis pela transcrição de proteínas envolvidas na resistência (DANGL; JONES, 2001).

Dentre os principais mecanismos de indução destacam-se a morte programada de células, fitoalexinas (metabólitos antimicrobianos), PR-proteínas (proteínas relacionadas a patogênese) tais como β -1,3-glucanases e quitinases, proteínas inibidoras de proteases, defensinas e lignificação da parede celular. As proteínas PR são acumuladas no local específico após a indução, atuando direta ou indiretamente contra o fitopatógeno (VAN LOON, 1997; OLIVEIRA et al., 2004).

As substâncias capazes de ativar respostas de defesa nas plantas, conhecidas como elicitores, atuam como indutores ou ativadores de resistência em plantas (STICHER et al., 1997). Os indutores podem ser usados na exploração de mecanismos de defesa por agirem

diretamente como moléculas sinais ou induzirem a ativação de genes que codificam a síntese de fatores de resistência (MÉTRAUX, 2001). Os genes de resistência estão associados com o incremento do ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (FEYS; PARKER, 2000; JALALI et al., 2006). A resistência sistêmica induzida e a resistência sistêmica adquirida são descritas em alguns trabalhos de forma distinta. A resistência sistêmica adquirida desenvolve-se de forma sistêmica em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica (reação de hipersensibilidade) ou por aplicação de indutores abióticos. Confere uma proteção efetiva contra um amplo espectro de patógenos, é dependente do ácido salicílico e está associada à produção de proteínas PR (VAN LOON et al., 1998; DURRANT; DONG, 2004). A resistência sistêmica induzida geralmente é causada por rizobactérias, não envolve o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese e é independente do ácido salicílico. Em substituição ao ácido salicílico, é ativada pelo aumento dos níveis de ácido jasmônico e etileno (VAN LOON et al., 1998; FEYS; PARKER, 2000; GRÜNER et al., 2003; GLAZEBROOK, 2005; BONALDO et al., 2005).

Até hoje se postula que a resistência sistêmica adquirida necessita de um sinal móvel para ser ativada nos tecidos infectados. Entretanto, Sang-Wook et al. (2007) observaram que mesmo em plantas deficientes na produção do ácido salicílico a resistência sistêmica adquirida pode ser ativada, não sendo, portanto, o AS o sinal móvel dessa resistência. Nesse mesmo estudo, foi observado que a atividade esterase da proteína AS-binding 2 (SABP2) converte o Metil salicilato (MeSA) em AS, sendo portanto o metil salicilato o sinal móvel desta resistência.

No âmbito molecular, a resistência sistêmica adquirida é caracterizada pelo expressivo incremento de um amplo número de genes relacionados a patogenicidade. A presença de um receptor é primordial nesse processo, sendo geralmente de natureza protéica, encontrando-se na membrana plasmática e no interior da célula. Os receptores

mediam a percepção de sinais derivados do patógeno ou elicitor, ativando proteínas, aumentando o fluxo de íons através da membrana plasmática, atividade de quinases e fosfatases e a produção de mensageiros secundários (CAVALCANTI et al., 2005).

O reconhecimento da molécula elicitora pelas proteínas receptoras induz inicialmente uma explosão oxidativa, caracterizada pela geração rápida e acúmulo de espécies ativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e oxigênio (H_2O_2 e O_2), sendo consideradas “ativas” porque não necessitam da entrada de energia para reagir com outras moléculas. Essas espécies ativas de oxigênio disparam a peroxidação dos lipídeos na membrana e a indução de outras respostas de defesa das células. A peroxidação de lipídeos ativa a cascata de sinalização do ácido jasmônico, levando à síntese de certas proteínas de defesa e fitoalexinas (VIJAYAN et al., 1998). O peróxido de hidrogênio pode ser diretamente tóxico ao patógeno e está envolvido no fortalecimento da parede celular e no processo de biossíntese da lignina (RESENDE et al., 2003).

4- Indutores de resistência

O composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico, também conhecido como: acibenzolar-S-metil, (ASM, BTH, CGA 245704, Bion[®] e Actigard[®]), derivado do benzotiadiazol, é um análogo do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor da resistência sistêmica adquirida (TERRY; JOYCE, 2004). Este composto conferiu proteção em morango (*Fragaria* sp.) contra *Botrytis cinerea* Pers.Fr. (TERRY; JOYCE, 2004), em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) contra o vírus TMV e os fungos *Cercospora nicotianae* Tehon & Daniels, *Peronospora tabacina* D.B. Adam, *Phytophthora parasitica* J. F. Dastur e as bactérias *P. carotovorum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Wolf & Foster (FRIEDRICH et al., 1996), em tomate contra a bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis

(BAYSAL *et al.*, 2003), em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) contra *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger (IRITI; FAORO, 2003), em melão (*Cucumis melo* L.) contra *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. e *Rhizopus* sp. (HUANG *et al.*, 2000) e em cacauero (*Theobroma cacao* L.) contra *Verticillium dahliae* (Kleb) e *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer (RESENDE *et al.*, 2007).

Indutores de resistência à base de acibenzolar-S-metil têm sido exaustivamente estudados nos últimos anos contra fungos, vírus e bactérias de plantas (RESENDE *et al.*, 2003; BONALDO *et al.*, 2005). Em tomateiro, o processo de indução de resistência sistêmica adquirida pelo uso do acibenzolar-S-metil, resultou na formação de caloses e depósito de compostos fenólicos junto às paredes das células do fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. (BENHAMOU; BÉLANGER, 1998). Em plântulas de melão tratadas com este indutor foi observado o aumento da atividade das proteínas PR quitinases e peroxidases (BUZI *et al.*, 2004). Em feijoeiro o uso do acibenzolar-S-metil alterou o metabolismo da planta, sendo a indução associada a aumentos na atividade da peroxidase, quitinase, β -1,3-glucanase, proteases, aumento da síntese de ligninas e aumento no teor de proteínas solúveis e açúcares redutores (KUHN, 2007).

O Ecolife[®] é um produto comercial originado de biomassa cítrica, ou de acordo com o fabricante Quinabra[®] uma formulação aquosa heterogênea contendo polifenóis, flavonóides, fitoalexinas e ácidos orgânicos diluídos. Tem se mostrado eficaz na proteção contra doenças nas culturas do pepino (*Cucumis sativus* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e cacauero (CAVALCANTI *et al.*, 2006). Em manga (*Mangifera indica* L.), mostrou-se eficiente contra *Lasiodiplodia theobromae* Pat. reduzindo a severidade da doença (DANTAS *et al.*, 2004). Esse produto contém substâncias antioxidantes que promovem alterações no metabolismo das plantas auxiliando a prevenção de doenças, regulando o

crescimento vegetal, processos reprodutivos e a melhora de produtos pós-colheita (MOTOYAMA et al., 2003).

Acibenzolar-S-metil e Ecolife[®] pulverizados em plantas de tomate contra *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Vauterin et al. conferiram 47,7% e 39,2% de proteção respectivamente, evidenciada pelo aumento da atividade de peroxidases e oxidases de polifenóis e discreto aumento no acúmulo de lignina (CAVALCANTI et al., 2006). Extratos aquosos dos cogumelos *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus blazei* Murrill e acibenzolar-S-metil reduziram significativamente a ocorrência da murcha-bacteriana em tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., observando-se um aumento na atividade da quitinase e peroxidase nas plantas tratadas com o indutor químico (SILVA et al., 2007). Em pimentão, o acibenzolar-S-metil mostrou-se eficiente para induzir resistência a diversas bactérias, como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *X. vesicatoria* (VENÂNCIO et al., 2000).

Os elicitores bióticos são complexos de carboidratos, lipídeos e proteínas, oriundos de leveduras, bactérias antagonistas ou fungos não patogênicos, que podem também induzir resistência em plantas contra fitopatógenos. Oligossacarídeos, proteínas e glicoproteínas, originados de fungos e bactérias, podem funcionar como eliciadores não específicos, para induzir respostas de defesa em plantas que carreguem genes R não específicos (BENATO, 2002; NÜRNBERGER; BRUNNER, 2002). Diferentes produtos utilizando microorganismos antagonistas em sua composição encontram-se disponíveis, a exemplo o Agro-Mos[®] (mananoligossacarídeo fosforilado) derivado da parede da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Meyer ex Hansen, que visa impedir a fixação do patógeno sobre os tecidos das plantas reduzindo as infecções e o desenvolvimento da doença (DANTAS, 2003).

5- Mecanismos bioquímicos de resistência

Diferentes alterações são observadas nas plantas por ocasião do ataque de patógenos. Com o objetivo de evitar a penetração, colonização e retirada de nutrientes do hospedeiro, as plantas utilizam estratégias para se defender, dentre as quais se destacam mecanismos estruturais e bioquímicos. Durante esses eventos ocorrem a síntese de metabólitos secundários antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio e ativação de genes que codificam proteínas PR como: glucanases, quitinases e fenilalanina, entre outras (GLAZERBROOK et al., 1997)

As PR-proteínas foram descritas pela primeira vez em 1970 por Van Loon, que observou o acúmulo de proteínas incomuns após infecção de plantas de fumo com o vírus do mosaico do fumo (DURRANT; DONG, 2004). Essas proteínas podem estar presentes na forma de fluídos intercelulares atuando diretamente em contato com o patógeno no processo de penetração do tecido ou acumuladas intracelularmente, nos vacúolos, onde geralmente exercem um efeito de defesa após a descompartimentalização das células (STICHER et al., 1997, CAVALCANTI et al., 2005). Existem 17 famílias distintas de proteínas PR, baseando-se na similaridade das seqüências de aminoácidos, relação sorológica e atividade enzimática ou biológica (GUZZO, 2003).

A peroxidase (PR-9), enzima comumente envolvida em respostas de defesa de plantas, é uma glicoproteína capaz de catalizar a produção de H_2O_2 , a formação de lignina, incorporação de glicoproteínas à parede celular, oxidação do ácido indol-3-acético, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa contra patógenos e aumento de reguladores de crescimento. Alterações nos seus padrões enzimáticos estão relacionadas com a defesa local e sistêmica da planta. Como outras enzimas, a peroxidase atua sobre as espécies ativas de oxigênio livrando a célula de seu efeito deletério. A alteração de sua

atividade é um indício de alteração do metabolismo da planta, como na formação da lignina pela polimerização de fenóis (LABANCA, 2002; CAVALCANTI et al., 2005).

As polifenoloxidasas oxidam um amplo grupo de fenóis sem a necessidade de H_2O_2 , também estão envolvidas na rota biossintética dos fenilpropanóides. Possuem a capacidade de produzir quinonas, por meio da oxidação de fenóis. A atividade da polifenoloxidase pode ser acrescida ou inibida em algumas plantas por estresses como injúria, toxicidade de nitrogênio e ataque de patógenos. No local onde ocorre a descompartimentação, provocada pelo patógeno, bem como nas células próximas a região de infecção, as peroxidases e polifenoloxidasas atuam na degradação oxidativa de compostos fenólicos, geralmente com o aparecimento de substâncias escuras proveniente da polimerização oxidativa das quinonas (CAMPOS et al., 2004). Normalmente a polifenoloxidase é elevada em tecidos infectados e apresenta grande importância para as plantas, pois está envolvida nos mecanismos de defesa e na senescência, onde o aumento na atividade dessas enzimas resulta em altas concentrações de produtos tóxicos e, portanto, em níveis maiores de resistência a infecções (AGRIOS, 2005).

As β -1,3-glucanases (PR-2) e as quitinases (PR-3), possuem atividade hidrolítica quebrando polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos, com atividade aumentada quando as plantas são tratadas com indutores de resistência (LABANCA, 2002). A PR2 são proteínas localizadas nos vacúolos e incluem principalmente as proteínas ácidas extracelulares. A PR-3 é constituída por endoquitinases que são agrupadas em seis classes distintas (I,II, IV, V, VI e VII), atuando diretamente nas paredes celulares de fungos, hidrolisando os polímeros de quitina, enfraquecendo-a e tornando as células osmoticamente sensíveis (GUZZO, 2003). Além das β -1,3-glucanases (PR-2) e quitinases (PR3) mostraram atividades antimicrobianas (STICHER et al., 1997).

Aumento da atividade de β -1,3-glucanases foi constatado em várias plantas, principalmente em feijoeiro comum e caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], após indução, com químicos ou organismos não patogênicos, reduzindo a severidade das doenças causadas por vários fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2001).

A lignificação da parede celular é um importante mecanismo de defesa, formado pela polimerização de precursores produzidos na rota dos fenilpropanóides, sendo iniciada pela deaminação da fenilalanina para ácido cinâmico e catalizada pela enzima fenilalanina amônia-liase. Vesículas armazenadoras de fenóis migram em direção à parede celular, onde ocorre a descompartimentalização dos fenóis das porções glicosídicas. Os fenóis livres sofrem oxidação, ligação à parede celular ou são polimerizados, sendo que a ação do H_2O_2 catalisada por uma peroxidase sobre os alcoóis 4-coumaril, coniferil e sinapil leva à geração de radicais livres e à formação de lignina. Diferentes mecanismos, como barreiras mecânicas, podem conter o avanço e o crescimento do patógeno, através da modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas e ação de toxinas produzidas por patógenos, impedindo que nutrientes do tecido hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

Os compostos fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos atuando em diferentes funções. Entre os compostos fenólicos com ação antimicrobiana destacam-se a lignina e os flavonóides. Dentre os flavonóides, os isoflavonóides tornaram-se conhecidos pela ação como fitoalexinas (TAIZ; ZEIGER, 2004). As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, produzidos pela planta em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. Constituem um grupo heterogêneo de substâncias pós-formadas que são sintetizadas, primeiramente, nos sítios de infecção dos patógenos. Entre esses compostos, os isoflavonóides, os furanoacetilenos ou os terpenóides parecem ser os mais importantes

(ROMEIRO, 2001). O modo de ação dos compostos fenólicos sobre os fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, refletindo na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e, ainda, redução ou inibição do crescimento micelial (CAVALCANTI et al., 2005).

6. Custo fisiológico da resistência

A utilização de substâncias e/ou microorganismos com objetivo de induzir resistência requer muitas vezes um custo fisiológico de adequação das plantas, podendo apresentar efeito negativo no seu desenvolvimento e na produção quando as plantas não estão infectadas (HEIL et al., 2000). Na natureza, as plantas são expostas a variações bióticas e abióticas que as forçam a se adaptarem através das alterações na atividade transcricional de diversos genes. Correlações negativas entre as taxa de crescimento máximo e a concentração de compostos secundários relacionados à defesa como celulose, hemicelulose, terpenóides e compostos fenólicos levaram a se propor a teoria do custo fisiológico da defesa (SUZUKI et al., 2006).

Em plantas de pimentão tratadas com acibenzolar-S-metil na ausência de doença, foi observada uma redução na produção e na maturação de frutos, reforçando a idéia de um custo energético para a planta cuja resistência é ativada (ROMERO et al., 2001). Fato contrário foi observado em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) que apresentaram crescimento rápido e maior biomassa do que as plantas tratadas com o indutor. Isso se deve provavelmente à competição entre a produção de compostos para a resistência contra o patógeno e para o crescimento da planta (HEIL et al., 2000).

Sementes de melão tratadas com acibenzolar-S-metil e ácido metil jasmônico apresentaram resistência a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm e apenas o primeiro

proporcionou proteção contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Foi observado porém que as sementes tratadas com os indutores químicos tiveram a germinação afetada, assim como houve diminuição no crescimento das plântulas. Este efeito foi atribuído ao custo da transferência de processos metabólicos envolvidos no crescimento para a síntese de compostos relacionados à defesa da planta (BUZI et al., 2004).

Boudet (1998) observou que plantas de tomate tratadas com Ecolife[®] mostraram redução significativa nos índices de severidade da mancha-bacteriana, porém, apresentaram um atraso no desenvolvimento vegetativo comparadas às testemunhas saudas. A inibição no crescimento é frequentemente associada à influência da deposição de lignina sobre a extensibilidade da parede celular primária, afetando a elongação celular.

Em condições limitantes como a deficiência de nutrientes, em especial o nitrogênio, o custo fisiológico da indução pode ter seus efeitos potencializados, uma vez que este elemento é um dos principais fatores limitantes do crescimento da planta, sendo fortemente afetado na expressão da resistência tanto constitutiva quanto induzida (DIETRICH, 2004). Hormônios vegetais como o ácido salicílico e o ácido jasmônico estão envolvidos em importantes processos de desenvolvimento das plantas, portanto, alterações em seus níveis podem interferir no crescimento e afetar a produção (HEIL et al., 2000).

7. Cálcio x doenças de plantas

A nutrição mineral pode reduzir a intensidade de doenças de plantas, proporcionando paredes celulares e cutículas mais espessas, manutenção dentro da célula de compostos solúveis, tais como açúcares simples e aminoácidos, maior suberização, silicificação e lignificação dos tecidos, maior síntese e acúmulo de compostos fenólicos e menor abertura de estômatos (HUBER, 2002). No entanto, a nutrição mineral pode

também ter um efeito secundário sobre a resistência de plantas ao ataque de herbívoros e microrganismos patogênicos. Dentre os nutrientes utilizados pela planta, o cálcio tem um papel crítico na divisão e desenvolvimento celular, na estrutura da parede celular e na formação da lamela média, sendo relativamente imóvel nos tecidos. A presença de cátions Ca^{2+} no tecido foliar, respeitando a quantidade ideal de potássio no conteúdo celular, inibe drasticamente a ação de enzimas pectolíticas produzidas por muitos fungos e bactérias fitopatogênicos, cuja função é dissolver a lamela média da parede celular. O acúmulo desse cátion pode facilitar a ligação entre os polímeros de pectina, particularmente na lamela média, evitando uma despolimerização da parede, aumentando assim sua resistência. O cálcio também reduz o desenvolvimento de doenças pós-colheita em frutos, ligando-se às pectinas presentes na parede celular, reduzindo a ação de enzimas pectinolíticas (MARSCHNER, 1995).

Chardonnet *et al.* (2000), trabalhando com *B. cinerea* em maçã, relataram além da inibição da atividade da poligalacturonase e da diminuição da susceptibilidade do tecido do hospedeiro, o efeito direto do cálcio sobre o desenvolvimento do fungo como mecanismo de ação no controle da podridão pós-colheita. Gomes *et al.* (2005) observaram que o Ca usado na forma de CaCl_2 reduziu a severidade da podridão-mole em frutos de tomate causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em 69,5%.

8. Antibióticos e leveduras no controle de doenças

O êxito ou fracasso do controle químico de fitobacterioses pode ser atribuído à maior ou menor eficácia dos princípios ativos aplicados, época de tratamento, dosagens e principalmente à sensibilidade ou resistência das populações do patógeno a bactericidas comumente empregados.

Antibióticos, são substâncias produzidas por microrganismos que atuando em baixas concentrações inibem o crescimento e, ou, a multiplicação de outros microrganismos (WAKSMAN, 1945). No emprego de antibióticos, é importante ter claro seus objetivos, aplicabilidade, custo, uso adequado, e principalmente sua interferência no ecossistema envolvido. O surgimento de resistência e a efetividade dos produtos envolvidos também devem ser considerados, uma vez que, antibióticos antes efetivos podem tornar-se ineficazes pelo uso continuado dos mesmos grupos químicos e/ou com modo de ação semelhante. O baixo número de agrotóxicos registrados para as diferentes culturas também contribuí nesse processo (ROMEIRO, 2005).

Existem registros de quatro formulados comerciais contendo antibióticos de uso agrícola, sendo eles a Agri-Micina[®] (oxitetraciclina 1,5% + estreptomicina 15%); o Agrimaicin 500[®] (oxitetraciclina 3% + sulfato de cobre 40%); o Kasumin[®] (kasugamicina 2%) e o Mycoshield[®] (oxitetraciclina 20%). Além do número reduzido de produtos, poucos deles são registrados para doenças bacterianas em hortaliças, implicando muitas vezes no uso incorreto dos produtos existentes. Não existem produtos registrados para podridão-mole em couve-chinesa causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. O Kasumin[®] é registrado para podridão-mole em cenoura e o Mycoshield[®] para canela-preta e podridão-mole em batata e cenoura, respectivamente (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997). No entanto, alguns relatos demonstram a baixa eficácia da estreptomicina e de alguns produtos cúpricos em lavouras de tomate e pimentão (MARCO; STALL, 1983; MARINGONI et al., 1986).

O modo de ação das oxitetraciclinas e tetraciclinas é a inibição da síntese de proteínas em bactérias, por interferirem na incorporação de aminoácidos ativados (aminoacil t-RNA) à cadeia protéica em formação no ribossoma. As estreptomicinas podem atuar no início da síntese protéica, por bloquear a formação do complexo iniciante

(associação do aminoacil t-RNA aos ribossomas), ou interferindo na leitura correta do código genético, causando a incorporação de aminoácidos diferentes, o que resulta em enzimas inativas ou não funcionais (KURILOWICZ, 1981).

Preventivamente, os antibióticos podem ser mais eficientes, mas quando a doença já está instalada no campo e as condições ambientais são favoráveis, essa eficiência diminui (BERIAM; MALAVOLTA JR, 2006).

No passado, assumia-se que os antibióticos eram facilmente absorvidos e translocáveis nos tecidos vegetais, possuindo efeito curativo e protetor. Bioensaios com folhas de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) demonstraram que o sulfato de estreptomicina não era absorvido nem se translocava nos tecidos da planta, embora permanecesse biologicamente ativo na superfície das folhas por até 16 dias (ROMEIRO, 1984). Trabalhos com plantas de pimentão mostraram os mesmos resultados. Normalmente, os produtos químicos sistêmicos como cloridrato de kasugamicina e oxitetraciclina, quando pulverizados na parte aérea das plantas são absorvidos e redistribuídos no limbo foliar. A translocação do produto de uma folha a outra ou da folha para o xilema do caule é praticamente nula (FRIGO, 2004).

Produtos cúpricos têm sido utilizados no controle de doenças bacterianas, tais como oxicleto de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso (LEITE JÚNIOR, 2000). A resistência a produtos cúpricos em bactérias fitopatogênicas foi observada pela primeira vez em *Xanthomonas* spp. associadas com doenças em pimentão (MARCO; STALL, 1983). Desde então, vários autores relataram a ocorrência de resistência ao cobre em *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. (AGUIAR et al., 2000; NAKAJIMA et al., 2002).

Diferenças na sensibilidade à estreptomicina já foram observadas entre isolados de *Xanthomonas* spp. causando mancha-bacteriana do tomateiro na Flórida - EUA no início

dos anos 60 (STALL; THAYER, 1962) e isolados resistentes à estreptomicina também foram encontrados no Caribe e na América Central (BOUZAR et al., 1999). Por outro lado, na Itália, onde o uso desse antibiótico não é permitido, nenhum isolado resistente dentre os obtidos de pimentão foi detectado (BUONAURIO et al., 1994). Resistência de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye ao cobre e estreptomicina também já foi citada por Araújo et al. (2003).

Ao contrário da estreptomicina, ainda há poucos relatos de resistência à oxitetraciclina. No Brasil, foram detectados isolados de *Xanthomonas* spp. resistentes ao cobre associados à mancha-bacteriana do tomate e pimentão originados principalmente dos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, embora nenhum isolado tenha sido resistente à oxitetraciclina (AGUIAR et al., 2000). Apenas dois relatos sobre a resistência de bactérias fitopatogênicas à oxitetraciclina foram encontrados, *P. syringae* pv. *syringae* van Hall, procedente de pomares de pera (*Pyrus communis* L.) nos Estados Unidos (SPOTTS; CERVANTES, 1995) e *P. syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al., em lavouras de tomate para indústria no Brasil (SILVA; LOPES, 1995).

Quezado-Duval et al. (2003) avaliaram a sensibilidade ao cobre em isolados de *Xanthomonas* spp. associados a mancha-bacteriana do tomateiro, inclusive *X. vesicatoria*. Nenhum dos isolados estudados foi resistente a oxitetraciclina, no entanto houve diferença quanto aos isolados estudados em relação ao sulfato de cobre e sulfato de estreptomicina. No cancro-bacteriano do tomateiro causado por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, apenas oxitetraciclina propiciou menor incidência de folíolos doentes em plantas inoculadas (THEODORO; MARINGONI, 2000).

O controle biológico também constitui uma alternativa viável dentro de um programa de manejo. Os microrganismos do filoplano consistem basicamente de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, que através de mecanismos tais como competição por

nutrientes, antibiose, indução de resistência e parasitismo dentre outros, podem exercer um controle biológico natural (LUZ, 1991).

O biocontrole utilizando leveduras vem sendo bastante utilizado, uma vez que esses microorganismos são integrantes da microbiota epifítica, endofítica e do solo onde se desenvolvem as plantas, não produzem antibióticos, competem por nutrientes, colonizam ferimentos e podem induzir resistência (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

As leveduras são representadas, principalmente por: *Aureobasidium* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp. e *Sporobolomyces* spp., (LUZ, 1991). O fator “killer”, um peptídeo tóxico liberado no meio de cultivo, capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos é produzido por determinadas cepas de *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces* spp., *Hansenula* spp., *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp., *Torulopsis* spp. (YOUNG, 1981), *Rhodotorula* spp. e *Trichosporon* spp. (MORACE et al., 1984). As leveduras podem ser utilizadas no controle de doenças como alternativa de proteção contra fitopatógenos, sendo observada mediante o emprego de *S. cerevisiae* em plantas de milho (*Zea mays* L), sorgo (*Sorghum* spp.), café, eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e maracujá contra diferentes patógenos (STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994). Gomes *et al.*, (2005), avaliando os microrganismos *Rhodotorula* sp. (LD-19) e *Pseudomonas* sp. fluorescente (P-2) no controle da podridão-mole em frutos de tomateiro causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* obtiveram uma redução da severidade da doença de 93% utilizando a levedura em combinação com CaCl_2 a 8% .

Por mais que a ação de indutores, leveduras e antibióticos seja conhecida no meio científico, sua utilização pelos agricultores em brássicas ainda é pouco freqüente, seja pela carência de informações científicas que justifiquem seu emprego ou pelo desconhecimento de sua ação protetora.

Considerando a importância da podridão-mole como fator limitante para a produção de couve-chinesa em algumas áreas do estado de Pernambuco e a dificuldade para encontrar medidas efetivas de controle da doença, os objetivos deste trabalho foram:

(i) avaliar o efeito de indutores de resistência no controle da podridão-mole causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em couve-chinesa e o custo fisiológico na indução (Capítulo II) e (ii) testar antibióticos comerciais e leveduras para o controle da doença (Capítulo III).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira: **O lugar especial da produção de hortaliças no agronegócio**. FNP- negócios e consultoria: São Paulo, 2004. 536p.

AGRIOS, G. N. (Ed.). **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

AGUIAR, L.; KIMURA, O.; CASTILHO, A. M. C.; CASTILHO, K. S. C.; RIBEIRO, R. L. D.; AKIBA, F.; CARMO, M.G. F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. **Agronomia**, v. 34, n. 1/2, p. 78-82, 2000.

ARAÚJO, J. S. P.; OLIVEIRA, B. C.; GONÇALVES, K. S.; CASTILHO, A. M. C.; RIBEIRO, R. L. D.; ROBBS, C. F. Resistência ao cobre em estirpes brasileiras de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, Suplemento, p. 339-340, 2003.

BAYSAL, Ö.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Berlin, v. 52, n. 6, p. 747-753, 2003.

BENATO, E. A. A indução de resistência no controle de doenças pós-colheita: frutas e hortaliças. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM

PLANTAS A FITOPATÓGENOS, 1., 2002, São Pedro. **Palestras...** São Pedro: ESALQ-USP, 2002. p. 29-31.

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, p. 263-267, 2004.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.1203-1212, 1998.

BERIAM, L. O. S. ; MALAVOLTA JR, V A . **Antibióticos: viabilidade do uso em sementes**. In: 9o.SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2006, Passo Fundo/RS. 9o. Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes. Passo Fundo/RS : Universidade de Passo Fundo, 2006.

BONALDO, M. B.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 13, p. 11-28.

BOUDET, A.M. A new view of lignification. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 67-71. 1998.

BOUZAR, H.; JONES, J.B.; STALL, F.J.; LOUWS, F.J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUIJN, de; JACKSON, L.E. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 4, p. 328-335, 1999.

BUONAURO, R.; STRAVATO, V.M.; SCORTICHINI, M. Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annuum* L. in Italy. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 3, p. 296-299, 1994.

BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-Smethyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 152, n. 1, p. 34-42, 2004.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão a antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 637-643, 2004.

CAMARGO FILHO, W. P; CAMARGO, F. P. Planejamento da produção sustentável de hortaliças folhosas: organização das informações decisórias ao cultivo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.38, n.3, 2008.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 13, p. 81-124.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., RIBEIRO JUNIOR, P.M., COSTA, J.C.B.; SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 372-380, 2006.

CHARDONNET, C.O.; SAMS, C.E.; TRIGIANO, R.N.; CONWAY, W.S. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology*, St.Paul, v. 90, n.7, p.769-774, 2000.

CEASA-PE. **Calendário de comercialização e outras informações de hortigranjeiros - CEASA-PE**. Recife: Secretaria de Agricultura, 2008. 4 p.

DANGL, J.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, London, n. 68, v. 411, p. 826-833, 2001.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M.; BEZERRA NETO, E. B.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.30, n.3, 2004.

DANTAS, S. A. F. **Doenças fúngicas pós-colheita em frutas de mamão e laranja: ocorrência e indução de resistência com elicitores bióticos e abióticos.** 2003. 88 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2003.

DE BOER, S. H.; KELMAN, A. *Erwinias* soft rot group. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (Eds.) **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.** 3 ed. Saint Paul: APS, 2001. p. 56-72.

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, p. 487-495, 1987.

DIETRICH, R. Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. **Plant, Cell and environment**, Oxford, v. 27, n.7, p. 896-906, 2004.

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, p. 954-960, 2004.

DURRANT, W. E.; DONG X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAOSTAT – Agricultural statistics database. Rome: World Agricultural Information Centre, 2007. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 20 Dez. 2007.

FEYS, B.J.; PARKER, J.E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genetics**, Oxford, v.16, n.1, p.449-455, 2000.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção de hortaliças. 1.ed. Viçosa: Editora UFV, 2000. 402p.

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, 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, p. 1017-1020, 1999.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; GUTRELLA, M.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J.-P.; KESSMAN, H.; RYALS, J., A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 61-70, 1996.

FRIGO, P. J. G. **Absorção, persistência e translocação de estreptomicina em plantas de pimentão**. 2004. 81f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

GLAZERBROOK, J.; ROGERS, E. E.; AUSUBEL, F. M. Use of *Arabidopsis* for genetics dissection of plant defense responses. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 31, p. 547-569, 1997.

GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 108-111, 2005.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 324p.

GRÜNER, R.; STROMPENT G.; PFITZNER, A.P.; PFITZNER, U.M. Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the as-1-like element of the PR-1a promoter. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, p. 4876-4886, 2003.

GUILHOTO, J. J. M.; SILVEIRA, F. G.; AZZONI C. A importância do Agronegócio familiar no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. Rio de Janeiro, v. 44, n. 33, p. 355-382, 2006.

GUZZO, S. D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 283-332, 2003.

HAYWARD, A. C.; MARIANO, R. L. R. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procaríotos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 5, p. 199-234, 1997.

HEIL, M.; HILPERT, A.; KAISER, W.; LINSÉNMAIR, K. E. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs?. **Journal of Ecology**, London, v. 88, p. 645-654, 2000.

HUANG, Y.; DEVERALL, B. J.; TANG, W.H.; WANG, W.; WU, F. W. Foliar application of acibenzolar-S-methyl and protection of postharvest Rock melons and Hami melons from disease. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.106, p.651-656, 2000.

HUBER, D. M. Relationship between mineral nutrition of plants and disease incidence. In: WORKSHOP – RELAÇÃO ENTRE NUTRIÇÃO DE PLANTAS E INCIDÊNCIA DE DOENÇAS, 1. 2002, Piracicaba. **Anais e vídeo...**, Piracicaba: Potafós, 2002. CD-ROM – VÍDEO 1.

HYMAN, L. J.; TOTH, I. K.; PÉROMBELON, M. C. M. Isolation and identification. In: PÉROMBELON, M. C. M.; VAN DER WOLF, J. M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. 2. ed. Invergowrie: **Scottish Crop Research Institute**, 2002. p. 66-59.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. SIDRA 01: Sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1996. Disponível em: <http: \\ www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 Dez. 2008.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. SIDRA 01: Sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006. Disponível em: <http: \\ www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 Dez. 2008.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.151, n.3, p.171-180, 2003.

JABUONSKI, 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, p. 317-319, 1988.

JALALI, B.L.; BHARGAVA S.; KAMBLE, A. Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.154, p.65-74, 2006.

KELMAN, A.; DICKEY, R. S. Detection of *Erwinia carotovora* and *E. chrysanthemi*. In: SAETTLER, A. W.; SCHAADN N. W.; ROTH, D. A. (Eds.) **Detection of bacteria en seed and other planting material**. Saint Paul: APS, 1995. p. 76-91.

KIKUMOTO, T. Ecology and biocontrol of soft rot of Chinese cabbage. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 66, p. 275-277, 2000.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KYEREMEH, A. G.; KIKUMOTO, T.; CHUANG, D. Y.; GUNJI, Y.; TAKAHARA, Y.; EHARA, Y. Biological control of soft rot of chinese cabbage using single and mixed treatments of bacteriocin-producing avirulent mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 66, p. 264-268, 2000.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*).**

2002. 107p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças – diagnose e controle**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1997. 70 p.

LUZ, W. C. DA. **Controle biológico das doenças na espermosfera. In: Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariuna: EMBRAPA Cnpda, 1991. 338p.

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, p. 1035-1042, 2001.

MALAVOLTA JR, V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SINIGAGLIA, C.; MALAVOLTA, V. M. A. Podridão-mole em couve-chinesa causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* no estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 60, p. 57-59, 1998.

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, p. 131-138, 2001.

MARCO, G.M.; STALL, R.E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 7, p. 779-781, 1983.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, rabanete, repolho e rúcula). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doença das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 315-324.

MARINGONI, A.C.; KUROZAWA, C.; BARBOSA, V.; SILVA NETO, J.C. Controle químico da mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye) do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 12, n. 1-2, p. 92-101, 1986.

MAROTO-BORREGO, J. V. M. **Horticultura herbácea especial**. Madrid: Mundi-Prensa, 1995. 615 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic Press, 1995. 889p.

MESSIAEN, C. M.; BLANCARD, D.; ROUXEL, F.; LAFON, R. **Enfermedades de las hortalizas**. Madrid: Grupo Mundi-Prensa, 1995. 576 p.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid current state of knowledge. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 8-13, 2001.

MEW, T. W.; HO, W. C.; CHU, I. Infectivity and survival of soft-rot bacteria in chinese cabbage. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 1325-1327, 1976.

MORACE, G.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITO, M.; POLONELLI, L. Strain differentiation of pathogenic yeasts by the killer system. **Mycopathology**, Den Haag, v. 84, p. 81- 85, 1984.

MOTOYAMA, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FIORITUTIDA, A. C. G.; SCAPIM, C. A. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium smitectum*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 25, p. 491-496, 2003.

NAKAJIMA, M.; GOTO, M.; HIBI, T. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 68-74, 2002.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and patogen-associated molecules. **Current Opinion Plant Biology**, Oxford, v. 5, p. 1-7, 2002.

OLIVEIRA, J. T. A.; ANDRADE, N. C.; MIRANDA, A. S. M.; BARRETO, A. L. H.; MELO, V. M. M.; FERNANDES, C. F.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; CAVALCANTI, F. R.; FREIRE-FILHO, F. R.; FREIRE, F. C. O.; GONÇALVES, F. J. T. Atividade peroxidásica e β -1,3-glucanases elicidadas por agentes bióticos causadores de doenças e pelo estresse hídrico em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In:

REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 5., 2001, Teresina: **Anais ...**
Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p. 19-23.

OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; GURGEL, L. M. S. Indução de resistência em doenças pós-colheita em frutas e hortaliças. **Revisão Anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, v. 12, p. 343-371, 2004.

PARK, S. W.; KAIMOYO, E.; KUMAR, D.; MOSHER, S.; KLESSIGT, D. F. Methyl Salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, v.318, p.113-116, 2008.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.

PÉROMBELON, M. C. M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of pathogenesis. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, 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.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; CAMARGO, L.E.A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n .4, p. 670-675, 2003.

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

RESENDE, M. L. V.; COSTA, J. C.; CAVALCANTI, F. R.; JUNIOR, P. M. R.; CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p.123-130, 2007.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2 ed. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 2005. 283 p.

ROMEIRO, R. S. Bioanálise para o estudo da persistência e absorção de estreptomicina em folhas de maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, p. 431. 1984.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001, 279 p.

ROMERO, A. M.; KOUSIK, C. S.; RITCHIE, D. F. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p.189-194, 2001.

SEO, S. T.; TAKANAMI, Y. Characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain on the basis of cellular fatty acid composition. **Journal of the Faculty of Agriculture (Kyushu University)**, Fukuoka, v. 46, p. 251-256, 2002.

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, p. 283-288, 2004.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de Resistência em Tomateiro por Extratos Aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 189-196, 2007.

SILVA, A. M. F. **Levantamento da intensidade da podridão-mole da alface e couve-chinesa nas regiões da Mata e Agreste do Estado de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras para avaliação da incidência da doença**. 2005. 55f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

SILVA, V. L.; LOPES, C. A. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a estreptomicina e oxitetraciclina em tomateiros pulverizados ou não com antibióticos agrícolas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 80-84, 1995.

SPOTTS, R.A.; CERVANTES, L.A. Copper, oxytetracycline, and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 11, p. 1132-1135, 1995.

STALL, R. E.; THAYER, P. L. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 46, n. 6, p. 389-392, 1962.

STANGARLIN, J.R; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica** , Botucau, v. 20, p. 6-21, 1994.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

SUZUKI, K.; NISHIUCHI, T.; NAKAYAMA, Y.; ITO, M.; SHINSHI, H. Elicitor-induced down-regulation of cell cycle-related gene in tobacco cells. **Plant, Cell and Environment**, Ventura, v. 29, p. 183-191, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**; Tradução: SANTAREM et al., 3o ed., Porto Alegre: Artmed, , 2004. 719p.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technoly**, Amsterdam, v.32, p.1-13, 2004.

THEODORO, G.F.; MARINGONI, A.C. Ação de produtos químicos in vitro e in vivo sobre *clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal do cancro bacteriano do tomateiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 439-443, 2000.

TOGASHI, J.; UEDA, K.; NAMAI, T. Overwintering of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in diseased tissues in soil and its role as inoculum for soft rot of chinese cabbage (*Brassica campestris*, Pekinensis group). **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 67, p. 45-50, 2001.

TOTH, I. A.; BELL, K. S.; HOLEVA, M. C.; BIRCH, P. R. J. Soft rot *Erwiniae*: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 17-13, 2003.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. V. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000, p. 41-56.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of plants Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, 1997.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE C. M. J. Systemic resistance induced by Rhizosphere bacteria. **Annual Reviews Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

VENÂNCIO, W. S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E. L.; SOUZA, N. L.; PERES, N. A. R. Novos fungicidas. II – Famaxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 59-92, 2000.

VIJAYAN, P.; SHOCKEY, J.; LÉVESQUE, C. A.; JAMES COOK, R; BROWSE, J. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 7209-7214, 1998.

WAKSMAN, S. A. **Microbial antagonism and antibiotic substances**. New York. The Commonwealth Fund, 1945.

YOUNG, T. W. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. **Journal of Institute Brewing**, London, v.87, p.292-295, 1981.

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



Capítulo II

**Efeito de indutores de resistência no controle da podridão-
mole em couve-chinesa**

1 MELLO MRF; SILVEIRA EB; PINTO KMS; GAMA MAS; CABRAL CP; MARIANO RLR. 2009. Efeito
2 de indutores de resistência no controle da podridão-mole em couve-chinesa. *Horticultura Brasileira...*

3

4 **Efeito de indutores de resistência no controle da podridão-mole em** 5 **couve-chinesa¹**

6 **Marcelo Rodrigues F de Mello^{2,3}; Elineide B da Silveira^{2,4}; Ivanise O Viana^{2,4}; Kedma M S Pinto^{2,4};**

7 **Marco Aurélio S da Gama^{2,4}; Cléidio da Paz Cabral^{2,4}; Rosa de Lima R Mariano^{2,4}**

8 ²PPGF-UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52071-900 Dois Irmãos, Recife-PE; ipacamocim2@yahoo.com.br;
9 rmariano@truenet.com.br; ³Bolsista CAPES; ⁴Bolsista CNPq

10

11

12

RESUMO

13 A produção de couve-chinesa (*Brassica pekinensis*) pode ser limitada pela
14 ocorrência da podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp.
15 *carotovorum* (Pcc). Os produtos acibenzolar-S-metil (ASM) (0,025 g/L), Ecolife[®] (2
16 mL/L), Agro-Mos[®] (2 mL/L) e óxido de cálcio (0,22 g/L) foram testados para controle
17 dessa doença avaliando-se a inibição do crescimento bacteriano “in vitro”, os
18 componentes epidemiológicos, a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase e o
19 custo fisiológico da indução. Em casa de vegetação e campo as plantas foram tratadas sete
20 dias após o transplante pela pulverização com os indutores em dosagem única acima
21 mencionada. Sete dias após a indução, as plantas foram inoculadas com o isolado Pcc120
22 do patógeno, exceto nos experimentos de atividade enzimática e custo fisiológico. Em
23 campo, no experimento de custo fisiológico, parcelas tratadas ou não com os indutores
24 foram avaliadas quanto à biomassa fresca da cabeça de couve-chinesa e biomassa seca das
25 raízes. O isolado bacteriano não foi inibido *in vitro* por nenhum dos produtos testados. A
26 incidência não foi reduzida em nenhum experimento. Em casa de vegetação, a severidade
27 final da doença foi reduzida em 47,5% pelos tratamentos Agro-Mos[®] (3,2) e ASM (3,2) em
28 comparação com a testemunha (6,1). Ambos também, respectivamente, reduziram o índice
29 de doença em 35,1% e 45,3% e propiciaram as menores áreas abaixo da curva de progresso

¹Parte da tese de doutorado do primeiro autor apresentada ao Curso de Pós-graduação em Fitopatologia (PPGF-UFRPE)

30 da doença (49,8 e 35,5) que diferiram da testemunha (102,7). A resistência induzida foi
31 evidenciada pela ausência de antibiose dos dois produtos contra o patógeno e pelo aumento
32 das atividades da peroxidase e polifeniloxidase. Em campo, apenas o ASM confirmou os
33 resultados de casa de vegetação reduzindo a intensidade da doença. Não houve custo
34 fisiológico para as plantas com aplicação do ASM e Agro-Mos®.

35

36 **Palavras-chave:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Brassica pekinensis*,
37 indução de resistência, peroxidase, polifenoloxidase.

38

39 ABSTRACT

40 Effect of resistance inducers for controlling Chinese cabbage soft rot

41

42 The production of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) may be limited by
43 occurrence of soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc).
44 The products acibenzolar-S-metil (ASM) (0.025 g L⁻¹), Ecolife® (2 mL L⁻¹), Agro-Mos® (2
45 mL L⁻¹) and calcium oxide (0.22 g L⁻¹) were tested for disease control through evaluation
46 of *in vitro* bacterial growth inhibition, epidemiological components, enzymatic activity of
47 peroxidase and polyphenoloxidase and physiological cost of induction. Under greenhouse
48 and field conditions seven days after transplant plants were sprayed once with inducers at
49 concentrations already cited. Seven days after induction, plants were inoculated with strain
50 Pcc120, except for enzymatic activity and physiological cost experiments. In field the
51 physiological cost experiment compared treated and no treated plots evaluating shoot fresh
52 biomass and root dry biomass. *In vitro* the bacterial isolate was not inhibited by any tested
53 products. The disease incidence was not reduced in any experiment. In greenhouse final
54 disease severity was reduced by 47.5% by Agro-Mos® (3.2) and ASM (3.2) compared with
55 control (6.1). Both products, respectively, also reduced disease index by 35.1 and 45.3%

56 and area under disease curve progress (49.8 and 35.5), which differed from control (102.7).
57 Induced resistance was confirmed by negative antibiosis against pathogen and increase of
58 peroxidase and polyphenoloxidase activities in treated plants. In field only ASM confirmed
59 greenhouse results by reducing disease intensity. There was no physiological cost for
60 plants sprayed with ASM or Agro-Mos[®].

61

62 **Keywords:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Brassica pekinensis*,
63 induction of resistance, peroxidase, polyphenoloxidase.

64

65 **(Recebido para publicação em... de... de 2009; aceito em... de... de 2009)**

66 *(Received in ..., 2009; accepted in ..., 2009)*

67

68 A podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
69 (Jones) Hauben *et al.* é uma doença de importância econômica em diversas culturas,
70 incluindo couve-chinesa (*Brassica pekinensis* L.) (Kikumoto, 1980), alface, beterraba,
71 couve, pimentão, repolho e tomate (Pérombelon, 2002). Levantamento realizado na
72 mesoregião Agreste do estado de Pernambuco em 2004 mostrou que a podridão-mole em
73 cultivos de couve-chinesa teve prevalência de 100% e incidência variando de 1 a 67%,
74 evidenciando a importância da doença para essa hortaliça (Silva *et al.*, 2005).

75 O controle da podridão-mole é muito difícil, uma vez que *P. carotovorum* subsp.
76 *carotovorum* apresenta grande variabilidade (Alvarado, 2006) e várias formas de
77 sobrevivência, inclusive no solo (Kikumoto, 1980; Pérombelon & Kelman, 1980), cujas
78 características, juntamente com os fatores ambientais, podem influenciar a população do
79 patógeno, acelerando ou retardando o desenvolvimento da doença (Pérombelon & Kelman,
80 1980).

81 A indução de resistência consiste no tratamento com agentes bióticos ou abióticos,
82 ativando mecanismos de defesa da planta ou parte desta contra o ataque de patógenos. É

83 uma proposta promissora no controle destas doenças (Bonaldo *et al.*, 2005) e, juntamente
84 com outros métodos dentro de um programa de manejo, pode evitar ou atrasar a entrada ou
85 a subsequente atividade do patógeno nos tecidos das plantas. (Resende *et al.*, 2007;
86 Cavalcanti *et al.*, 2006).

87 O acibenzolar-S-metil (ASM) possibilita proteção em campo contra um amplo
88 espectro de doenças em diversas espécies cultivadas, sendo exaustivamente estudado nos
89 últimos anos como indutor químico de resistência contra fungos, vírus e bactérias (Gorlach
90 *et al.*, 1996; Bonaldo *et al.*, 2005). O Ecolife[®], um produto comercial originado de
91 biomassa cítrica, contendo em sua formulação polifenóis, flavonóides, fitoalexinas e ácidos
92 orgânicos diluídos, tem se mostrado eficaz na proteção de doenças nas culturas do pepino,
93 cafeeiro e cacauero. O Agro-Mos[®] (mananoligossacarídeo fosforilado) derivado da parede
94 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* 1026 Meyer ex Hansen, pode também induzir
95 resistência em plantas (Dantas, 2003). Dentre os macronutrientes, o cálcio tem um papel
96 crítico na divisão, desenvolvimento celular, estrutura da parede celular e formação da
97 lamela média, podendo reduzir a ação de enzimas pectinolíticas produzidas por patógenos
98 que degradam a parede celular vegetal (Huber, 2002).

99 Dentre os principais mecanismos de indução de resistência destacam-se as PR-
100 proteínas (proteínas relacionadas a patogênese), como a peroxidase, β -1,3-glucanases,
101 quitinases e polifenoloxidasas. As PR-proteínas são acumuladas em local específico após a
102 indução, atuando direta ou indiretamente contra o fitopatógeno (Van Loon, 1997;
103 Cavalcanti *et al.*, 2006). Apesar das vantagens, a utilização de indutores de resistência
104 pode requerer um custo fisiológico de adequação das plantas e influenciar negativamente o
105 desenvolvimento e produção, na ausência da infecção (Heil *et al.*, 2000).

106 Considerando a importância da podridão-mole como fator limitante para a produção
107 de couve-chinesa em algumas áreas do estado de Pernambuco e a dificuldade de medidas

108 efetivas de controle para esta doença, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de
109 diferentes indutores no controle da podridão-mole causada por *P. carotovorum* subsp.
110 *carotovorum* em couve-chinesa, bem como, a atividade enzimática e o custo fisiológico da
111 indução para a planta.

112

113 MATERIAL E MÉTODOS

114

115 **Avaliação dos indutores de resistência em laboratório e casa de vegetação** -No
116 Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
117 foi realizado um ensaio de inibição *in vitro* do crescimento de *P. carotovorum* subsp.
118 *carotovorum* (Pcc) com os indutores ASM (0,025 g/L), Ecolife[®] (2 mL/L), Agro-Mos[®] (2
119 mL/L) e óxido de cálcio (0,22 g/L). Oxitetraciclina a 2,0% (3 g/L) e água destilada
120 esterilizada foram utilizados como testemunhas. Discos de papel de filtro de 6 mm de
121 diâmetro foram embebidos em 10 µL de cada produto e, após secagem, foram transferidos
122 para o meio ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura NYDA (20 ágar, 10 glicose, 5
123 extrato de levedura, 3 extrato de carne, 5 peptona bacteriológica g/L de água destilada) em
124 placa de Petri, ao qual fora previamente incorporado 0,1 mL da suspensão bacteriana do
125 isolado Pcc120 com concentração de 10⁹ UFC/mL. Os halos de inibição foram avaliados
126 48 h após a incubação.

127 Em casa de vegetação da Área de Fitossanidade, do Departamento de Agronomia,
128 da UFRPE foram realizados dois experimentos. No primeiro, os produtos foram testados
129 para o controle da doença e no segundo foi estudada a atividade enzimática induzida pelos
130 produtos selecionados.

131 Plantas de couve-chinesa cultivar AF-75 foram semeadas em bandejas com substrato
132 Mecplant[®] e aos 20 dias após plantio, transplantadas para vasos de plásticos de 3L

133 contendo solo:substrato (1:3, v:v). Sete dias após o transplante, ASM, Ecolife[®], Agro-
134 Mos[®] e óxido de cálcio foram aplicados por pulverização nas dosagens citadas
135 anteriormente. Sete dias após a aplicação dos indutores, as plantas foram inoculadas pelo
136 método de picada com palito de dente esterilizado na base do pecíolo da segunda folha
137 definitiva. No ferimento, com o auxílio de um micropipetador, foram depositados 5 µL da
138 suspensão bacteriana com concentração de 10⁹ UFC/mL. Após a inoculação, as plantas
139 foram submetidas à câmara úmida por 6 h, utilizando sacos plásticos umedecidos com água
140 destilada. Durante o período dos experimentos a temperatura em casa de vegetação variou
141 de 25 a 35 °C. As avaliações foram realizadas inicialmente a cada hora durante as
142 primeiras seis horas após a inoculação e, posteriormente, a intervalos de seis horas até 48
143 h, considerando-se os seguintes componentes epidemiológicos: **(a)** incidência (INC)
144 número de plantas doentes em relação ao total de plantas inoculadas; **(b)** período de
145 incubação (PI), determinado pelo número de horas entre a inoculação e o surgimento dos
146 sintomas da doença; **(c)** severidade inicial da doença (SEVI), às seis horas após a
147 inoculação, estimada com o auxílio de escala descritiva de 1 a 9 (Ren *et al.*, 2001), onde: 1
148 = sem lesão no ponto de inoculação; 2 = lesões menores que 5 mm; 3 = lesões entre 5 e 10
149 mm; 4 = lesões maiores que 10 mm, porém não atingindo as folhas; 5 = lesão alcançando o
150 limbo foliar e o caule principal; 6 = caule infectado, porém sem atingir as folhas não
151 inoculadas; 7 = caule e folhas não inoculadas infectadas; 8 = planta inteira próxima a
152 morte; 9 = planta morta; **(d)** severidade final da doença (SEVF), às 48 h após a inoculação,
153 estimada com o auxílio da escala descritiva; **(e)** área abaixo da curva de progresso da
154 doença (AACPD), calculada conforme Shaner & Finney (1977) pela expressão: AACPD =
155 $[\sum (y_i + y_{i+1})/2 \cdot d_{ii}]/n$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de severidade observados em duas
156 avaliações consecutivas, d_{ii} o intervalo entre as avaliações e n a duração do período de

157 avaliação; (f) índice de doença (IDO), calculado pela fórmula $IDO = \Sigma (\text{grau da escala} \times$
158 $\text{frequência}) \times 100 / (\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})$.

159 No segundo experimento em casa de vegetação, foi avaliado o efeito dos produtos
160 selecionados ASM e Agro-Mos[®] na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase.
161 O plantio e condução do experimento foram similares ao de seleção de produtos. A
162 avaliação foi realizada sete e quatorze dias após a aplicação dos indutores nas dosagens já
163 mencionadas, coletando-se uma folha de cada uma das quatro plantas de cada tratamento,
164 as quais foram fragmentadas e homogeneizadas, retirando-se 2 g para preparo do extrato
165 bruto enzimático.

166 Nestes dois experimentos, os delineamentos experimentais foram inteiramente
167 casualizados com, respectivamente, cinco e três tratamentos, com quatro repetições, sendo
168 a unidade experimental constituída por um vaso com uma planta. As determinações
169 analíticas foram repetidas três vezes.

170

171 **Determinação da atividade enzimática** - No preparo do extrato bruto enzimático, 2
172 g de folhas foram maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido adicionando-se 0,3 g de
173 polivinilpirrolidona (PVP) e 4,0 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 5,0),
174 contendo 1nM de EDTA. As amostras foram congeladas em freezer -20°C durante 12 h e,
175 após este período, centrifugadas a 14.000 rpm por 25 minutos (4°C), transferindo-se o
176 sobrenadante para novos tubos de eppendorfs, armazenado-os a -20°C para determinação
177 do teor de proteínas totais e atividade enzimática. O teor de proteínas totais foi
178 determinado de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976). A
179 análise da atividade da peroxidase (EC1.11.1.7) foi realizada conforme protocolo descrito
180 por Dann & Deverall (2000), enquanto que a da polifenoloxidase (EC 1.14.18.1) foi obtida
181 de acordo com Campos *et al.* (2004).

182

183 **Avaliação dos indutores de resistência em campo** - Em campo comercial,
184 localizado no Município de Camocim de São Félix-PE, foram realizados dois
185 experimentos, sendo o primeiro com os indutores que apresentaram melhores resultados
186 em casa de vegetação e o segundo para avaliar o custo fisiológico desses mesmos
187 indutores. A metodologia utilizada para aplicação dos indutores foi a mesma descrita para
188 os experimentos em casa de vegetação, exceto pelo plantio, realizado em solo natural com
189 textura areno-argilosa, sendo as mudas com 20 dias transplantadas com espaçamento de 70
190 x 30 cm e irrigação por gotejo com rega diária. O patógeno foi inoculado apenas no
191 primeiro experimento, conforme metodologia já descrita.

192 No experimento de indução de resistência foram avaliados: incidência da doença,
193 período de incubação, severidade inicial, severidade final, área abaixo da curva de
194 progresso da doença e índice de doença, conforme descrito anteriormente. No experimento
195 de custo fisiológico, a avaliação foi realizada ao término do ciclo da cultura com 70 dias,
196 observando-se a massa fresca da cabeça de couve-chinesa e a massa seca das raízes.

197 Em ambos os experimentos foi utilizado o delineamento em blocos inteiramente
198 casualizados, com quatro blocos e três tratamentos por bloco, incluindo a testemunha,
199 sendo a unidade experimental constituída por dez plantas.

200

201 **Análises estatísticas** - Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as
202 médias comparadas pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram
203 realizadas com o auxílio do programa SAEG[®] 9.0 (Sistema de Análises Estatísticas e
204 Genéticas, Universidade Federal de Viçosa, 2005).

205

RESULTADOS E DISCUSSÃO

206

207

208 Não foi observado nenhum efeito inibitório dos indutores testados em relação ao
209 crescimento de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum in vitro*. Tal fato refuta a hipótese de
210 proteção das plantas pela ação direta dos indutores sobre o patógeno, ou seja, antibiose. A
211 ausência de atividade antibiótica *in vitro* é um dos critérios utilizados para se distinguir
212 resistência induzida de outros mecanismos de controle de doenças. Também Silva *et al.*
213 (2007), não observaram inibição significativa do crescimento de *R. solanacearum in vitro*
214 pelo ASM, porém Cavalcanti *et al.* (2006), demonstrou o efeito inibitório do Ecolife®
215 sobre o crescimento *in vitro* de *X. vesicatoria*. Estas dessemelhanças de sensibilidade
216 podem ser atribuídas a diferenças entre patógenos, isolados e regiões.

217 Em casa de vegetação a incidência da doença foi de 100% em todos os tratamentos
218 (Tabela 1). Apenas o tratamento com Agro-Mos® aumentou significativamente ($P \leq 0,05$) o
219 período de incubação, sendo os primeiros sintomas detectados na base das folhas das
220 plantas inoculadas cerca de 24 h após a inoculação, retardando, portanto o aparecimento da
221 doença, que na testemunha ocorreu aproximadamente 16 horas após a inoculação Os
222 tratamentos Agro-Mos® e ASM reduziram o índice de doença, a severidade final da doença
223 e a área abaixo da curva de progresso da doença. O índice de doença foi reduzido em 45,3
224 e 35,1%, respectivamente pelo ASM (35,5) e o Agro-Mos® (42,1) em relação à testemunha
225 (64,9). A severidade final foi reduzida em 47,5% por ambos indutores (3,2) em relação a
226 testemunha (6,1) enquanto as áreas abaixo da curva de progresso da doença observadas
227 para o Agro-Mos® (49,8) e ASM (35,5) evidenciaram diferenças de 51,5 e 65,4% em
228 relação à testemunha (102,7).

229 Não houve efeito do óxido de cálcio e Ecolife® nas variáveis epidemiológicas
230 estudadas. O cálcio pode reduzir a ação de enzimas pectinolíticas produzidas por

231 patógenos que degradam a parede celular (Huber, 2002). A não eficiência do cálcio,
232 isoladamente, pode estar relacionada com a fonte deste macronutriente, óxido de cálcio
233 e/ou com teor inadequado de boro na planta. O boro desempenha papel significativo para as
234 brássicas, atuando na incorporação do cálcio na parede celular e na expansão celular, com
235 efeito direto no crescimento e desenvolvimento dessas hortaliças (Alvares *et al.*, 1985).

236 Não existem muitos estudos testando o Ecolife[®] contra doenças bacterianas. Este
237 produto protegeu plantas de tomate contra a mancha-bacteriana e induziu o aumento da
238 atividade de peroxidases, polifenoloxidase e acúmulo de lignina, além do efeito inibitório
239 *in vitro* contra *X. vesicatoria* (Cavalcanti *et al.*, 2006), discordando dos resultados aqui
240 apresentados.

241 Aos sete dias após a aplicação dos produtos ASM e Agro-Mos[®], apenas as plantas
242 tratadas com ASM apresentaram diferenças significativas das atividades das enzimas
243 peroxidase e polifenoloxidase ($P \leq 0,05$) em relação à testemunha (Tabela 2). Já aos 14
244 dias, plantas tratadas com os dois produtos evidenciaram maiores atividades ($P \leq 0,05$)
245 apenas para peroxidase.

246 O aumento na atividade de enzimas pela aplicação de indutores de resistência em
247 plantas tem sido amplamente demonstrado. A detecção de um incremento na atividade da
248 peroxidase aos sete dias após tratamento com ASM e 14 dias após tratamento com ASM e
249 Agro-Mos[®] sugere que esta enzima esteja relacionada com a redução da severidade final da
250 doença. O estudo da atividade de peroxidase aos sete e 14 dias após a aplicação dos
251 produtos teve como objetivo confirmar o prolongamento desta atividade por 14 dias, tempo
252 necessário para o início da formação da cabeça no campo. Esta proteção ampliada será
253 importante no manejo da podridão-mole. O aumento da atividade da peroxidase em alguns
254 tratamentos reforça a possibilidade de que a expressão dessa enzima tenha ocorrido de
255 forma induzida e não constitutiva. A indução de resistência ocorre por meio do

256 reconhecimento da molécula elicitora pelas proteínas receptoras, induzindo inicialmente
257 uma explosão oxidativa, caracterizada pela geração rápida e acúmulo de espécies ativas de
258 oxigênio, resultando na biossíntese de lignina (Cavalcanti *et al.*, 2005).

259 Plantas tratadas com os dois produtos e a testemunha não apresentaram diferenças
260 significativas quanto à atividade de polifenoloxidase 14 dias após a aplicação dos produtos.
261 Daí infere-se que nas condições do experimento, a polifenoloxidase foi mais ativa sete dias
262 após o tratamento enquanto a peroxidase teve ação mais prolongada. As maiores atividades
263 da peroxidase associadas ao ASM e Agro-Mos[®] e da polifenoloxidase associada ao ASM
264 observadas neste trabalho resultam em reforço da parede celular e podem estar associadas
265 com indução de resistência local e sistêmica (Anterola & Lewis, 2002). Em plantas, a
266 polifenoloxidase tem sido associada também à lignificação, além de ser um fator na
267 proteção de plantas injuriadas contra outros organismos invasores, pela ação tóxica de
268 quinonas reativas produzidas a partir da catálise de compostos fenólicos (Mayer & Staples,
269 2002).

270 Em campo também não foi observada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os
271 tratamentos com relação à incidência da doença que foi de 100% (Tabela 3). O tratamento
272 com ASM aumentou o período de incubação (20,3 h) em relação à testemunha (19,2 h),
273 embora em menor escala que o Agro-Mos em casa de vegetação (Tabela 1). O ASM
274 também reduziu o índice de doença (38,8) e severidade final (3,4) em 13% e 19,0%
275 respectivamente, em relação à testemunha (44,6 e 4,2). Os tratamentos ASM e Agro-Mos[®]
276 apresentaram AACPD de (70,5) e (74,5) respectivamente, correspondendo a reduções de
277 11,8 e 6,8% em relação à testemunha (80,0). Desta forma, observou-se que os resultados
278 do ASM no campo mantiveram-se, embora em menor escala, o que não aconteceu com o
279 Agro-Mos[®] que apenas reduziu a AACPD.

280 Os produtos ASM e Agro-Mos[®] em casa de vegetação e ASM em campo, aplicados
281 sete dias antes da inoculação com *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, reduziram a
282 intensidade da podridão-mole em plantas de couve-chinesa. Por se tratar de uma doença
283 extremamente destrutiva, a podridão-mole pode acarretar perdas relevantes na mesorregião
284 do Agreste de Pernambuco onde, segundo Silva *et al.* (2005) a doença ocorre em 100% das
285 áreas de cultivo com incidência variando de 1 a 67%. Considerando que a couve-chinesa
286 tem ciclo curto, de 60 a 70 dias, a fase crítica de infecção ocorre próximo aos 20 dias após
287 o transplante, período em que as folhas e, principalmente as nervuras, tocam o solo e
288 inicia-se a formação da cabeça. Neste período, os tecidos da planta estão mais susceptíveis
289 à ação de enzimas pectinolíticas, embora as perdas continuem nas fases de colheita,
290 estocagem e transporte (Ren *et al.*, 2001). Ponderando ainda que o patógeno é
291 extremamente agressivo, o retardamento da doença pelos produtos ASM e Agro-Mos[®]
292 representado pelo aumento do período de incubação; e a redução da intensidade da doença
293 representada pela diminuição da severidade final, do índice de doença e da área abaixo da
294 curva de progresso da doença aos 20 dias de implantação da cultura é importante. Isto
295 deverá restringir a doença às folhas mais velhas e evitar ou minimizar a infecção no caule
296 da planta, desta forma possibilitando a colheita e comercialização do produto pelo
297 agricultor, o que muito contribuirá para o manejo da doença.

298 Apesar de não terem sido encontrados na literatura consultada, exemplos de
299 controle da podridão-mole em qualquer crucífera pelos indutores estudados, existem
300 relatos de controle de doenças bacterianas em outras hortaliças. O ASM é um indutor de
301 resistência amplamente reconhecido com efetividade de controle em tomateiro contra
302 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum* (Silva *et al.*, 2003;
303 Silva *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2005), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

304 (Soylu *et al.*, 2003); e em batata cvs. Asterix e Baronesa contra *Pectobacterium*
305 *atrosepticum* (Benelli *et al.*, 2004).

306 Em campo não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos
307 ASM, Agro-Mos[®] e testemunha com relação às variáveis biomassa fresca da cabeça e
308 biomassa seca das raízes de couve-chinesa. Isto significa que não houve custo fisiológico
309 da indução com a aplicação dos dois produtos que apresentaram maiores reduções de
310 intensidade da doença. Esta é uma das principais preocupações no uso de indutores de
311 crescimento, levando até a exclusão do uso de produtos em espécies ou interações
312 indutor/espécie que apresentam alto custo fisiológico. Portanto, este resultado significa que
313 mesmo ocorrendo a indução da resistência, a couve-chinesa não apresenta redução de
314 crescimento.

315 Aplicações de ASM em tomateiros inoculados com *X. vesicatoria* não causaram
316 custo fisiológico (Cavalcanti *et al.*, 2006). Da mesma forma, cacauzeiros pulverizados com
317 ASM não diferiram na biomassa fresca da parte aérea das plantas apenas inoculadas com
318 *Verticillium dahliae* (Cavalcanti *et al.*, 2004). Esses relatos demonstram que esse indutor
319 não causou perdas metabólicas, ou seja, compostos destinados ao crescimento da planta
320 não foram utilizados para síntese de compostos de defesa (Heil & Bostock, 2002). Em
321 contraposição, o uso do ASM em feijoeiro alterou o metabolismo da planta, gerando custo
322 metabólico traduzido por redução da produtividade (Kuhn, 2007) e, em condições de
323 deficiência de nitrogênio, este indutor prejudicou a cultura do trigo pelo alto custo
324 fisiológico envolvido (Heil & Bostock, 2002).

325 Os resultados em campo são promissores, primeiro por se tratar de uma doença
326 extremamente destrutiva e de difícil controle, e, segundo, pelo fato dos indutores não
327 interferirem no desenvolvimento das plantas. No entanto, devido ao baixo nível de redução
328 da intensidade da doença, estes produtos apenas deverão ser recomendados se aplicados

329 em conjunto com outras medidas de controle, dentro de um programa de manejo para a
330 podridão-mole da couve-chinesa.

331

332

AGRADECIMENTOS

333

334 Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro (Proc.
335 479.622/2004-3) e bolsas de Iniciação Científica, Apoio Técnico e Produtividade em
336 Pesquisa.

337

338

REFERÊNCIAS

339

340 ALVARADO ICM. 2006. *Variabilidade e ecologia de Pectobacterium carotovorum subsp.*
341 *carotovorum, agente da podridão-mole em couve-chinesa*. Recife: Universidade
342 Federal Rural de Pernambuco. 100p (Tese doutorado).

343 ALVARES MC; OLIVEIRA S.; MATTOS JKA; MESQUITA FILHO MV. 1985.
344 Resposta de repolho a adubação com bórax. *Horticultura Brasileira* 3: 18-21.

345 ANTEROLA AM; LEWIS NG. 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive
346 analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular
347 integrity. *Phytochemistry* 61: 221-294.

348 ARAUJO JSP; GONÇALVES KS; OLIVEIRA BC; RIBEIRO RLD; POLIDORO JC.
349 2005. Efeito do acibenzolar-S-metil sobre a murcha-bacteriana do tomateiro.
350 *Horticultura Brasileira* 23: 5-8.

351 BENELLI AIH; DENARDIN ND; FORCELINI C. 2004. Ação do acibenzolar-S-metil
352 aplicado em tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitada por

- 353 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. *Fitopatologia Brasileira* 29:
354 263-267.
- 355 BONALDO MB; PASCHOLATI SF; ROMEIRO RS. 2005. Indução de resistência: noções
356 básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI
357 SF.; RESENDE MLV; ROMEIRO R. S. (Eds.) *Indução de resistência em plantas a*
358 *patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, 13: 11-28.
- 359 BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram
360 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*
361 *Biochemistry* 72: 248-254.
- 362 CAMPOS AD; FERREIRA AG; HAMPE MMV; ANTUNES IF; BRANÇÃO N;
363 SILVEIRA EP; OSÓRIO VA; AUGUSTIN E. 2004. Atividade de peroxidase e
364 polifenoloxidase na resistência do feijão a antracnose. *Pesquisa Agropecuária*
365 *Brasileira* 39: 637-643.
- 366 CAVALCANTI FR; RESENDE MLV; ZACARONI AB; RIBEIRO JUNIOR PM;
367 COSTA JCB; SOUZA RM. 2006. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de
368 respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas*
369 *vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira* 31: 372-380.
- 370 CAVALCANTI LS; BRUNELLI KR; STANGARLIN JR. 2005. Aspectos bioquímicos e
371 moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI LS; DI PIERO RM;
372 PASCHOLATI SF; RESENDE MLV; ROMEIRO RS. (Eds.). *Indução de resistência*
373 *em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ 13: 81-124.
- 374 CAVALCANTI LS; RESENDE MLV. 2004. Efeito da época de aplicação e dosagem do
375 acibenzolar-s-metil na indução de resistência à murcha-de-verticillium em cacauero.
376 *Fitopatologia Brasileira* 30: 67-71.

- 377 DANN EK; DEVERALL BJ. 2000. Activation of systemic disease resistance in pea by na
378 avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen.
379 *Plant Pathology* 49: 324-332.
- 380 DANTAS SAF. 2003. *Doenças fúngicas pós-colheita em frutas de mamão e laranja:*
381 *ocorrência e indução de resistência com elicitores bióticos e abióticos*. Recife PE:
382 Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tese de doutorado).
- 383 GORLACH J; VOLRATH S; KNAUF-BEITER G; HENGY G; BECKHOVE U; KOGEL
384 KH; OOSTENDORP M; STAUB T; WARD E; KESSMANN H; RYALS J. 1996.
385 Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene
386 expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* 8: 629-643.
- 387 HEIL M; BOSTOCK MR. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in
388 the context of induced plant defenses. *Annals of Botany* 89: 503-512.
- 389 HEIL M; HILPERT A; KAISER W; LINSENMAIR KE. 2000. Reduced growth and seed
390 set following chemical induction of pathogen defense: does systemic acquired
391 resistance (SAR) incur allocation costs. *Journal of Ecology* 88: 645-654.
- 392 HUBER DM. 2002. Relationship between mineral nutrition of plants and disease
393 incidence. In: WORKSHOP – RELAÇÃO ENTRE NUTRIÇÃO DE PLANTAS E
394 INCIDÊNCIA DE DOENÇAS, 1. 2002, Piracicaba. *Anais e vídeo...*, Piracicaba:
395 Potafós, CD-ROM – VÍDEO 1.
- 396 KIKUMOTO T. 1980. Ecological aspects of soft rot bacteria. *Report of the Institute for*
397 *Agricultural Research* (Tohoku University) 31: 19-41.
- 398 KUHN OJ. 2007. *Indução de resistência em feijoeiro (Phaseolus vulgaris) por*
399 *acibenzolar-S-metil e Bacillus cereus: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros*
400 *de crescimento e produção*. Piracicaba: USP-ESALQ. 140p. (Tese Doutorado).

- 401 MAYER AM; STAPLES RC. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme.
402 *Phytochemistry* 60: 551-565.
- 403 McKINNEY RH. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat
404 seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26:195-218.
- 405 PÉROMBELON MCM. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of
406 pathogenesis. *Plant Pathology* 51: 1-12.
- 407 PÉROMBELON MCM; KELMAN A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual*
408 *Review of Phytopathology* 18: 361-387.
- 409 REN J; PETZOLDT R; DICKSON MH. 2001. Genetics and population improvement
410 resistance to bacterial soft rot Chinese cabbage. *Euphytica* 117:197-207.
- 411 RESENDE MLV; COSTA JC; CAVALCANTI FR; JUNIOR PMR; CAMILO FR. 2007.
412 Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de
413 defesa em cacauzeiro contra a vassoura-de-bruxa. *Fitopatologia Brasileira* 28:123-130.
- 414 SHANER G; FINNEY RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of
415 slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 15: 1051-1056.
- 416 SILVA AMF; MARIANO LR; MICHEREFF SJ; SILVEIRA EB; MEDEIROS FHV.
417 2005. Levantamento da intensidade da podridão-mole da alface e couve-chinesa em
418 Pernambuco. *Caatinga* 20: 84-83.
- 419 SILVA LHCP; RESENDE MLV; SOUZA RM; CAMPOS JR; CASTRO AMS. 2003.
420 Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por acibenzolar-
421 S-metil. *Summa Phytopathologica* 29: 77-181.
- 422 SILVA RF; PASCHOLATI SF; BEDENDO IP. 2007. Indução de Resistência em
423 Tomateiro por Extratos Aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra
424 *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira* 32: 189-196.

- 425 SOYLU S; BAYSAL O; SOYLU EM. 2003. Induction of disease resistance by the plant
426 activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter*
427 *michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science* 165: 1069-
428 1075.
- 429 VAN LOON LC. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related
430 proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753-765.
- 431
- 432

433

TABELAS

434 **Tabela 1.** Efeito de ASM, Ecolife[®], Agro-Mos[®] e óxido de cálcio no controle da
 435 podridão-mole da couve-chinesa, avaliado pelas variáveis, período de incubação (PI),
 436 índice de doença (IDO), severidade final (SEVF) e área abaixo da curva de progresso da
 437 doença (AACPD) em condições de casa de vegetação, Departamento de Agronomia,
 438 UFRPE, Recife, PE, 2008.

TRATAMENTO ¹	PI ² (horas)	IDO ²	SEVF ²	AACPD ²
Acibenzolar-S-metil (0,025 g/L)	19,5 ³ b	35,5 b	3,2 b	35,5 b
Ecolife [®] (2,0 g/L)	17,7 b	64,4 a	5,8 a	105,0 a
Óxido de cálcio (0,22 g/L)	16,8 b	66,6 a	6,0 a	93,4 ab
Agro-Mos [®] (2,0 g/L)	23,7 a	42,1 b	3,2 b	49,8 c
Testemunha	15,6 b	64,9 a	6,1 a	102,7 a
C.V. (%)	9,9	8,5	5,7	19,9

439 ¹Indutores aplicados em plantas com 27 dias e inoculação com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* sete
 440 dias após indução; ²PI= número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença; IDO= calculado
 441 de acordo com McKinney (1923); SEVF= determinada às 48 h após a inoculação, com o auxílio da escala descritiva
 442 de Ren *et al.* (2001); AACPD= calculada segundo Shaner & Finney (1977); ³Média de quatro repetições; médias
 443 seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan (P≤0,05).

444

445

446 **Tabela 2.** Efeito de ASM e Agro-Mos[®] na atividade enzimática da peroxidase e
 447 polifenoloxidase aos 7 e 14 dias após a aplicação em couve-chinesa, em condições de casa
 448 de vegetação, Departamento de Agronomia, UFRPE, Recife, PE, 2008.

TRATAMENTO ¹	7 dias		14 dias	
	Peroxidase	Polifenoloxidase	Peroxidase	Polifenoloxidase
	(U/mg proteína)			
Acibenzolar-S-metil (0,025 g/L)	7,1 ² a	23,4a	4,1a	3,7a
Agro-Mos [®] (2,0 g/L)	5,0b	9,9b	3,9a	3,0a
Testemunha	4,3b	6,3b	2,8b	3,2a
C.V. (%)	16,5	28,1	42,5	15,7

449 ¹Indutores aplicados em plantas com 27 dias; ²Média de quatro repetições; médias seguidas por letras iguais não diferem
 450 entre si pelo teste de Duncan (P≤0,05).

451

452

453

454 **Tabela 3.** Efeito de ASM e Agro-Mos[®] no controle da podridão-mole em couve-chinesa,
 455 avaliado pelas variáveis, período de incubação (PI), índice de doença (IDO), severidade
 456 final (SEVF) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em campo
 457 comercial localizado no município de Camocim de São Félix, PE, 2008.

TRATAMENTO ¹	PI ² (horas)	IDO	SEVF	AACPD
Acibenzolar-S-metil (0,025 g/L)	20,3 ³ a	38,8b	3,4b	70,5a
Agro-Mos [®] (2,0 g/L)	18,8b	44,6a	4,0a	74,5a
Testemunha	19,2b	44,6a	4,2a	80,0b
C.V. (%)	5,4	9,4	7,9	13,9

458 ¹Indutores aplicados em plantas com 27 dias e inoculação com *Pectobacterium carotovorum* subsp.
 459 *carotovorum* sete dias após indução; ²PI= número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da
 460 doença; IDO= calculado de acordo com McKinney (1923); SEVF= determinada às 48 h após a inoculação, com
 461 o auxílio da escala descritiva de Ren *et al.* (2001); AACPD= calculada segundo Shaner & Finney (1977);
 462 ³Média de quatro repetições; médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan
 463 (P≤0,05).

464

465

466 **Tabela 4.** Avaliação do custo fisiológico da indução pelo acibenzolar-S-metil e Agro-
 467 Mos[®] em couve-chinesa, utilizando as variáveis, biomassa fresca da cabeça de couve-
 468 chinesa (BFC) e biomassa seca das raízes (BSR), em campo comercial localizado no
 469 Município de Camocim de São Félix, PE, 2008.

TRATAMENTO ¹	BFC(Kg)	BSR(g)
Acibenzolar-S-metil (0,025 g/L)	1,87 ² a	2,8 a
Agro-Mos [®] (2,0 g/L)	1,84 a	2,9 a
Testemunha	1,81 a	2,3 a
C.V. (%)	16,2	5,8

470 ¹Indutores aplicados em plantas com 27 dias; ²Média de quatro repetições; médias seguidas por
 471 letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan (P≤0,05).



Capítulo III

**Efeito de antibióticos e leveduras no controle da podridão-
mole em couve-chinesa**

1 MELLO MRF; SILVEIRA EB; VIANA IO; GUERRA ML; MARIANO RLR 2009. Utilização de
2 antibióticos e leveduras no controle da podridão-mole em couve-chinesa. *Horticultura Brasileira...*

3

4 **Efeito de antibióticos e leveduras no controle da podridão-mole em** 5 **couve-chinesa¹**

6 Marcelo Rodrigues F de Mello^{2,3}; Elineide B da Silveira^{2,4}; Ivanise O Viana^{2,4}; Myrzânia de Lira Guerra^{2,4};
7 Rosa de Lima R Mariano^{2,4}

8 ²PPGF-UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52071-900 Dois Irmãos, Recife-PE; ipacamocim2@yahoo.com.br;
9 rmariano@truenet.com.br; ³Bolsista CAPES; ⁴Bolsista do CNPq

10

11

RESUMO

12 A podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) é
13 um fator limitante a produção de couve-chinesa (*Brassica pekinensis*). Avaliou-se a
14 sensibilidade “in vitro” de Pcc a bactericidas, o efeito de Mycoshield[®] (oxitetraciclina
15 20%) nas dosagens de 3,0 e 1,5 g/L, e das leveduras (Rh1 e Rh2 - *Rhodotorula* spp. e Sc1 -
16 *Saccharomyces cerevisiae* a 10⁸ cel/mL) no controle da doença em casa de vegetação e em
17 campo. As plantas foram pulverizadas com Mycoshield[®] e leveduras sete dias após o
18 transplante, e inoculadas por picada com o isolado Pcc120, sete dias e 12 h após o
19 tratamento, respectivamente. Em ambos os casos foram avaliados os componentes
20 epidemiológicos da doença. In vitro, 40 isolados de Pcc testados apresentaram resistência
21 ao sulfato de cobre e sensibilidade a oxitetraciclina, estreptomicina,
22 oxitetraciclina+estreptomicina e oxitetraciclina+sulfato de cobre, todos na concentração de
23 0,2 g/L. Seis isolados de Pcc foram significativamente mais inibidos por Mycoshield[®] do
24 que por Agri-Micina[®] (oxitetraciclina 1,5% + estreptomicina 15%), não sendo inibidos
25 por Kasumin[®] (casugamicina 2%). Em casa de vegetação, o Mycoshield[®] na dosagem 3,0
26 g/L reduziu a severidade e o índice de doença em até 47,4 e 19%; já a levedura Sc1 reduziu
27 a severidade da doença e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em até
28 27,6 e 39,3%, respectivamente, enquanto Rh1 reduziu a AACPD em até 33,5. Em campo,
29 o Mycoshield[®] reduziu o índice de doença, a severidade final e a AACPD em
30 respectivamente 14,4; 15,5 e 28,9%; enquanto que Rh1 reduziu o índice de doença em
31 8,8% e Sc1 reduziu a AACPD em 15,7%. Conclui-se que tanto o Mycoshield[®] quanto as
32 leveduras apresentaram baixa eficiência para o controle da podridão-mole da couve-
33 chinesa em campo.

³Parte da Tese de Doutorado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal Rural de Pernambuco (2009).

34
35 **Palavras-chave:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Brassica pekinensis*,
36 *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp., oxitetraciclina, estreptomicina.

37
38

ABSTRACT

39 **Effect of antibiotics and yeasts on the control of Chinese cabbage soft rot**

40 The soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) is a limiting
41 factor of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) production under favorable conditions. It
42 was evaluated the *in vitro* sensibility to bactericides, and the effect of Mycoshield®
43 (oxitetracycline 20%) at 3.0 and 1.5 g L⁻¹, and yeasts (Rh1 and Rh2 - *Rhodotorula* spp. and
44 *Sc1* - *Saccharomyces cerevisiae* at 10⁸ cel mL⁻¹) to control the disease in greenhouse and
45 field. Plants were sprayed with Mycoshield® and yeasts seven days after transplant and
46 inoculated by pricking with isolate Pcc120 seven days and 12 h after treatment,
47 respectively. In all experiments disease epidemiological components were evaluated. *In*
48 *vitro* 40 Pcc isolates were resistant to copper sulfate and sensitive to oxitetracycline,
49 streptomycin, oxitetracycline + streptomycin and oxitetracycline + copper sulfate all at 0.2
50 g L⁻¹. Six Pcc isolates were significantly more inhibited by Mycoshield® than by Agri-
51 Micina® (oxitetracycline 1.5% + streptomycin 15%), but there was no inhibition by
52 Kasumin® (Kasugamicin 2%). In greenhouse Mycoshield® at 3.0 g L⁻¹ reduced disease
53 severity and disease index until 47.4 and 19.0%. The yeast *Sc1* reduced disease severity
54 and area under disease curve progress (AUDCP) till 27.6 and 39.3% respectively, while
55 Rh1 reduced AUDCP until 33.5%. In field Mycoshield® reduced disease index, final
56 severity and AUDCP by 14.4; 15.5 and 28.9% respectively; while Rh1 reduced disease
57 index by 8.8% and *Sc1* diminished the AUDCP by 15.7%. In conclusion Mycoshield® and
58 yeasts showed low efficiency for controlling soft-rot of Chinese cabbage in field.

59

60 **Keywords:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Brassica pekinensis*,
61 *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp., oxitetracycline, streptomycin.

62

63 (Recebido para publicação em... de... de 2009; aceito em... de... de 2009)

64

(Received in ..., 2009; accepted in ..., 2009)

65

66 O estado de Pernambuco é um dos principais produtores de crucíferas no Nordeste
67 brasileiro, sendo os municípios de Camocim de São Felix e Chã Grande os maiores
68 produtores de couve-chinesa (*Brassica pekinnensis* L.). Em 2004, no Agreste de
69 Pernambuco, foi constatada prevalência de 100% da podridão-mole da couve-chinesa em
70 todas as áreas produtoras amostradas, com incidência variando de 1 a 67% (Silva *et al.*,
71 2005).

72 A podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
73 (Pcc) (Jones) Hauben *et al.* é uma doença de importância econômica em diversas culturas,
74 incluindo couve-chinesa (Kikumoto, 1980), alface, beterraba, couve, pimentão, repolho e
75 tomate (Pérombelon, 2002). O controle desta doença é muito difícil, uma vez que Pcc
76 sobrevive na água, no solo, em restos culturais infectados, na rizosfera de plantas
77 cultivadas ou invasoras e epifiticamente na filosfera de plantas hospedeiras ou invasoras
78 (Kikumoto, 1980; Pérombelon & Kelman, 1980).

79 Para controle da podridão-mole em diferentes hospedeiros recomenda-se o uso de
80 variedades resistentes (Ren *et al.*, 2001), plantas transgênicas (Fray *et al.*, 1999; Mãe *et al.*,
81 2001), controle biológico (Dong *et al.*, 2004; Manefield *et al.*, 2001), uso de cálcio (Flego
82 *et al.*, 1997), indutores de resistência (Benelli *et al.*, 2004) e emprego de antibióticos ou
83 fungicidas cúpricos (Zambolim *et al.*, 1997).

84 Na utilização de antibióticos para controle de bacterioses deve-se considerar o
85 custo, registro para a cultura, período de carência e, principalmente, a interferência no
86 ecossistema envolvido. O reduzido número de agroquímicos registrados para doenças
87 bacterianas em hortaliças favorece a utilização de produtos indevidos e ineficazes. Existem
88 registros de quatro formulados comerciais contendo antibióticos de uso agrícola, sendo eles
89 a Agri-Micina[®] (oxitetraciclina 1,5% + estreptomicina 15%); o Agrimaicin[®] 500
90 (oxitetraciclina 3% + sulfato de cobre 40%); o Kasumin[®] (casugamicina 2,0%) e o

91 Mycoshield[®] (oxitetraciclina 2,0%). Não existem produtos registrados para podridão-mole
92 em couve-chinesa. O Kasumim[®] é registrado para podridão-mole em cenoura e o
93 Mycoshield[®] para canela-preta e podridão-mole em batata e cenoura, respectivamente
94 (Lopes; Quezado-Soares, 1997).

95 O controle biológico juntamente com outras práticas de controle constitui uma
96 alternativa viável dentro de um programa de manejo de doenças de plantas. Segundo
97 Valdebenito-Sanhueza (2000), o biocontrole utilizando leveduras vem sendo bastante
98 utilizado, uma vez que esses microrganismos são integrantes da microbiota epifítica,
99 endofítica e do solo onde se desenvolvem as plantas, competem por nutrientes, colonizam
100 ferimentos e podem induzir resistência. As principais leveduras biocontroladoras são
101 *Aureobasidium* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp. e
102 *Sporobolomyces* spp. (Valdebenito-Sanhueza, 2000).

103 Considerando a importância da podridão-mole como fator limitante para a produção
104 de couve-chinesa em algumas áreas do estado de Pernambuco e a dificuldade na aplicação
105 de medidas efetivas de controle para esta doença, o objetivo deste trabalho foi avaliar o
106 efeito de antibióticos e leveduras no controle da doença.

107

108 MATERIAL E MÉTODOS

109

110 **Obtenção de isolados e preparo de suspensões** - Os 40 isolados de *P.*
111 *carotovorum* subsp. *carotovorum* foram obtidos da Coleção de Culturas do Laboratório de
112 Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), provenientes de
113 plantas de couve-chinesa e alface com infecção natural, coletadas nos municípios de
114 Camocim de São Félix, Chã Grande e Vitória de Santo Antão (Tabela 1). Estes isolados
115 estavam preservados em água destilada esterilizada (ADE) e foram reativados através de

116 repicagem para meio ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose - NYDA (20 ágar, 10
117 glicose, 5 extrato de levedura, 3 extrato de carne, 5 peptona bacteriológica g/L de água
118 destilada). Os isolados foram cultivados em tubos contendo NYDA e incubados à
119 temperatura de 28 ± 2 °C durante 36-48 h. As suspensões bacterianas foram preparadas em
120 ADE e a concentração ajustada em fotocolorímetro (Analyser 500M) $A_{570} = 0,36$, que
121 corresponde a aproximadamente 1×10^9 UFC/mL.

122 As leveduras foram obtidas da coleção de culturas do Laboratório de
123 Fitobacteriologia do Departamento de Agronomia da UFRPE [*Rhodotorula* sp. 4IIIA
124 (Rh1) e *Rhodotorula* sp. 4IIIB (Rh2); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (Sc1) e
125 *Saccharomyces* spp. (Sc sp.)] e da Micoteca do Departamento de Micologia da
126 Universidade Federal de Pernambuco [*S. cerevisiae* (2658 e 5107); *Pichia*
127 *membranaefaciens* Hansen (2611); *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud (2571 e
128 2837) e *Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison (5368)]. Os isolados de leveduras foram
129 cultivados em tubos contendo NYDA e incubados à temperatura de 28 ± 2 °C durante 36-48
130 h. As suspensões foram preparadas em ADE e a concentração ajustada em câmara de
131 Neubauer para 10^8 cel/mL.

132 **Sensibilidade “in vitro” de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* a**
133 **bactericidas** - Foram utilizados 40 isolados de Pcc de origem já mencionada no item
134 anterior. Alíquotas de 5 µL das suspensões bacterianas, preparadas conforme metodologia
135 já detalhada, foram depositadas em triplicata sobre meio NYDA suplementado com
136 oxitetraciclina, estreptomicina e sulfato de cobre (200 ppm) e misturas de oxitetraciclina +
137 estreptomicina; oxitetraciclina + sulfato de cobre e estreptomicina + sulfato de cobre. As
138 placas foram mantidas em incubadora B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) a 28 ± 2 °C
139 durante 48 horas e a avaliação foi realizada considerando-se como resistentes os isolados
140 que apresentaram crescimento confluyente nas três repetições.

141 Seis isolados de Pcc selecionados com base na reação aos bactericidas, ao
142 hospedeiro e município de origem foram testados para sensibilidade a Agri-Micina[®]
143 (Pfizer[®]- oxitetraciclina, 1,5%; sulfato de estreptomicina, 15%), Kasumin[®] (Arysta
144 Lifescience[®]- casugamicina 2,0%) e Mycoshield[®] (Pfizer[®] - oxitetraciclina, 20%),
145 utilizando dosagens recomendadas para hortaliças, respectivamente 3,0 g/L, 2,0 g/L e 3,0
146 g/L. A partir de colônias crescidas por 36-48 h em NYDA, foi feita uma suspensão
147 bacteriana concentrada em ADE. Alíquotas de 3 mL da suspensão bacteriana foram
148 adicionadas a Erlenmeyer contendo 100 mL de meio NYDA fundente, homogeneizando-se
149 manualmente e vertendo-se em placas de Petri. Após a solidificação do meio, discos de
150 papel de filtro contendo os antibióticos nas dosagens citadas foram colocados em quatro
151 pontos equidistantes da placa de Petri. As testemunhas foram constituídas por discos de
152 papel de filtro contendo apenas ADE. As placas foram mantidas em incubadora B.O.D. a
153 28±2 °C durante 24 h e a avaliação realizada pela medição do halo de inibição do
154 crescimento bacteriano em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma
155 régua milimetrada.

156 O primeiro experimento foi qualitativo, com delineamento inteiramente casualizado
157 e três repetições, sendo a unidade experimental uma placa com três pontos de deposição.
158 No segundo experimento, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em
159 arranjo fatorial 3 x 6 (três antibióticos x 6 isolados de Pcc), com quatro repetições, sendo
160 cada repetição constituída por uma placa com quatro discos do antibiótico.

161 **Efeito de Mycoshield[®] no controle da podridão-mole da couve-chinesa em casa**
162 **de vegetação** - Em casa de vegetação, sementes de couve-chinesa AF-75 (Sakata[®] Seed
163 Sudamerica Ltda.) foram semeadas em bandejas com substrato Mecplant[®]. Aos 20 dias
164 após plantio, foram transplantadas para vasos plásticos contendo 3 L da mistura
165 solo:substrato (1:3). Sete dias após o transplante, o Mycoshield[®], previamente selecionado

166 “in vitro”, foi aplicado nas dosagens 3,0 g/L e 1,5 g/L, pulverizando-se as plantas até o
167 escorrimento. Sete dias após aplicação do Mycoshield[®], as plantas foram inoculadas pelo
168 método de picada (com palito de dente esterilizado) na base do pecíolo da segunda folha
169 definitiva. No ferimento, com auxílio de micropipetador foram depositados 5 µL da
170 suspensão bacteriana de Pcc120. A testemunha foi tratada com água destilada e inoculada
171 com Pcc120. Após a inoculação, as plantas foram submetidas à câmara úmida por 6 h,
172 utilizando sacos plásticos umedecidos. Durante o período dos experimentos, a temperatura
173 em casa de vegetação variou de 25 a 35°C.

174 As avaliações foram realizadas inicialmente a cada hora durante as primeiras seis
175 horas após a inoculação e, posteriormente, a intervalos de seis horas até 48 h,
176 considerando-se os seguintes componentes epidemiológicos: **(a)** incidência (INC) número
177 de plantas doentes em relação ao total de plantas inoculadas; **(b)** período de incubação (PI),
178 determinado pelo número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da
179 doença; **(c)** severidade inicial da doença (SEVI), às seis horas após a inoculação, estimada
180 com o auxílio de escala descritiva de 1 a 9 (Ren *et al.*, 2001); **(d)** severidade final da
181 doença (SEVF), às 48 h após a inoculação, estimada com o auxílio da escala descritiva; **(e)**
182 área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), calculada conforme Shaner &
183 Finney (1977) pela expressão: $AACPD = [\sum (y_i + y_{i+1})/2 \cdot d_{ti}]/n$, onde y_i e y_{i+1} são os valores
184 de severidade observados em duas avaliações consecutivas, d_{ti} o intervalo entre as
185 avaliações e n a duração do período de avaliação; **(f)** índice de doença (IDO), calculado
186 pela fórmula $IDO = \sum (\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100 / (n^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau}$
187 máximo da escala).

188 O delineamento foi inteiramente casualizado, com três tratamentos (Mycoshield[®] em
189 duas dosagens + testemunha), cada tratamento com quatro repetições e a unidade
190 experimental constituída por cinco plantas.

191 **Efeito de leveduras no controle da podridão-mole em couve-chinesa –**
192 Inicialmente, foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro em nervuras de folhas
193 destacadas com dez isolados *Rhodotorula* sp. 4IIIA (Rh1), *Rhodotorula* sp. 4IIIB (Rh2), *S.*
194 *cerevisae* (Sc1, 2658 e 5107), *Saccharomyces* sp. (Sc sp.), *P. membranaefaciens* (2611); *A.*
195 *pullulans* (2571 e 2837) e *R. minuta* (5368). O segundo experimento foi de antibiose “in
196 vitro” contra Pcc120, utilizando as três leveduras selecionadas no primeiro experimento.

197 Folhas de couve-chinesa, cultivar AF-75 (Sakata® Seed Sudamerica Ltda.) foram
198 lavadas com água e sabão, sendo as nervuras principais separadas e desinfestadas com
199 hipoclorito de sódio (1:2 v:v), enxaguadas duas vezes com água destilada e secas ao ar
200 sobre papel toalha. As nervuras foram acomodadas em bandejas plásticas e no sentido do
201 seu comprimento foram realizadas cinco perfurações com intervalos de 2,5 cm e
202 profundidade de 2 mm. Sobre cada perfuração foram depositados 5 µL da suspensão de
203 leveduras preparada conforme já descrito, e após 12 h, a bactéria foi inoculada pela
204 deposição de 5 µL da suspensão bacteriana sobre as perfurações. Nervuras tratadas com
205 água destilada e inoculadas com Pcc120 constituíram a testemunha. As bandejas foram
206 colocadas em câmara úmida por 24 h e as avaliações foram realizadas medindo-se o
207 comprimento (mm) da lesão produzida pela bactéria nos pontos de inoculação, nas
208 primeiras seis horas a intervalos de uma hora e posteriormente em intervalos de seis horas
209 até as 48 h após a inoculação.

210 O experimento teve delineamento inteiramente casualizado com onze tratamentos
211 (10 leveduras + testemunha), cada tratamento teve cinco repetições e a unidade
212 experimental foi constituída por uma nervura com cinco pontos de inoculação.

213 O efeito inibitório de três leveduras selecionadas no experimento em nervuras
214 destacadas contra Pcc120 foi analisado utilizando-se o método de antibiose. Alíquotas de 3
215 mL da suspensão bacteriana foram colocadas em 100 mL de meio NYDA fundente,

216 homogeneizando-se manualmente e vertendo-se em placas de Petri. Após a solidificação,
217 alíquotas de 5 µL das suspensões de leveduras foram depositadas em quatro pontos
218 equidistantes sobre o meio de cultura. Na testemunha foram depositadas alíquotas de 5 µL
219 de ADE. As placas foram mantidas em incubadora B.O.D. a 28 ± 2 °C durante 24-48 horas e
220 a avaliação foi realizada observando-se o halo de inibição do crescimento bacteriano.

221 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos
222 (três leveduras + testemunha) e quatro repetições, sendo a unidade experimental
223 constituída por uma placa com quatro pontos de deposição.

224 Em casa de vegetação, sementes de couve-chinesa cultivar AF-75 foram semeadas
225 em bandejas com substrato Mecplant[®] e após 20 dias foram transplantadas para vasos de
226 plásticos de 3 L (solo:substrato, 1:3). Sete dias após o transplante, 10 mL das suspensões
227 das três melhores leveduras selecionadas “in vitro” foram aplicadas por pulverização na
228 segunda folha definitiva. Após 12 h foi realizada a inoculação pelo método de picada com
229 palito de dente esterilizado na base do pecíolo dessa folha. No ferimento, com o auxílio de
230 um micropipetador, foram depositados 5 µL da suspensão bacteriana de Pcc120. A
231 testemunha foi composta de plantas tratadas com água destilada e inoculadas com Pcc120.
232 Após a inoculação, as plantas foram submetidas à câmara úmida por 6 h, utilizando sacos
233 plásticos umedecidos. Durante o período dos experimentos, à temperatura em casa de
234 vegetação variou de 25 a 35°C. Foram avaliados, conforme já descrito, os componentes
235 epidemiológicos PI, IDO, SEVF e AACPD.

236 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por quatro
237 tratamentos (três leveduras + testemunha), cada tratamento com quatro repetições sendo a
238 unidade experimental constituída por cinco plantas.

239 **Efeito de Mycoshield[®] e leveduras no controle da podridão-mole em campo** -Em
240 campo comercial de couve-chinesa foram testados o Mycoshield[®] na dosagem mais

241 eficiente (3,0 g/L) e as leveduras Sc1 e Rh1, previamente selecionados em casa de
242 vegetação. A metodologia utilizada para aplicação do antibiótico, da levedura e para
243 inoculação de Pcc120 foi semelhante à descrita nos experimentos de casa de vegetação. O
244 plantio foi realizado em solo natural com textura areno-argilosa, sendo as mudas
245 preparadas em bandejas com substrato, transplantadas aos 20 dias com espaçamento de 70
246 x 30 cm e irrigadas diariamente por gotejamento.

247 O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, composto por
248 quatro blocos, cada bloco com quatro tratamentos (Mycoshield[®], duas leveduras e
249 testemunha), sendo a unidade experimental constituída por 10 plantas.

250 **Análises estatísticas** – No primeiro experimento foi realizado o teste de correlação
251 de Pierson entre hospedeiro, município e reação a sulfato de cobre + estreptomicina. Todos
252 os outros dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste
253 de Duncan ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do
254 programa SAEG[®] 9.0 (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Universidade Federal
255 de Viçosa, 2005).

256

257

RESULTADOS E DISCUSSÃO

258 Os 40 isolados de Pcc apresentaram sensibilidade “in vitro” aos bactericidas
259 oxitetraciclina e estreptomicina na concentração de 200 ppm, bem como às misturas
260 oxitetraciclina + sulfato de cobre e oxitetraciclina + estreptomicina. Por outro lado, foi
261 observada resistência de todos os isolados ao sulfato de cobre a 200 ppm e variação quanto
262 à sensibilidade a mistura de sulfato de cobre + estreptomicina, sendo 62,5% dos isolados
263 resistentes (Dados não apresentados). Não houve correlação entre hospedeiro, município e
264 reação a sulfato de cobre + estreptomicina (Pierson, $P \leq 0,05$).

265 Seis isolados Pcc46, Pcc78, Pcc84, Pcc112, Pcc118 e Pcc 120, representativos de
266 couve-chinesa, alface e dos municípios Camocim de São Félix, Chã Grande e Vitória de
267 Santo Antão, todos sensíveis a oxitetraciclina, estreptomicina, oxitetraciclina + sulfato de
268 cobre e oxitetraciclina + estreptomicina e resistentes ao sulfato de cobre e ao sulfato de
269 cobre + estreptomicina foram selecionados para o teste de antibiose. Nesse teste, houve
270 interação significativa entre antibióticos comerciais e isolados (Tabela 2). Todos isolados
271 foram resistentes ao Kasumin[®] e sensíveis a Agri-Micina[®] e Mycoshield[®], com halos de
272 inibição significativamente maiores para este último antibiótico. Mycoshield[®] inibiu ainda
273 com maior intensidade os isolados Pcc78 (2,3), Pcc84 (2,2) e Pcc118 (2,0).

274 Nos municípios estudados não é comum a aplicação de Kasumin[®] em cultivos de
275 couve-chinesa ou alface, fato que justificaria a resistência a casugamicina. No entanto,
276 sabe-se que a resistência a antibióticos é governada por mecanismos genéticos e os genes
277 para resistência podem estar presentes, tanto no cromossomo principal como em
278 plasmídeos. Em alguns casos, toda a população bacteriana já é naturalmente resistente a
279 um ou vários antibióticos e existem vários exemplos em bacteriologia de plantas,
280 denominando-se resistência múltipla constitutiva (Romeiro, 2005). A sensibilidade
281 encontrada a Agri-Micina[®] e Mycoshield[®] confirmou a reação dos quarenta isolados de
282 Pcc aos princípios ativos destes produtos. Isto pode indicar que a sua utilização em alface e
283 couve-chinesa nos municípios analisados ainda é incipiente; fato importante,
284 principalmente pela falta de registro dos mesmos para estas hortaliças.

285 Os bactericidas mais utilizados comercialmente são os antibióticos oxitetraciclina e
286 sulfato de estreptomicina e os cúpricos (Romeiro, 1995) oxiclureto de cobre, sulfato de
287 cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso (Leite Júnior, 2000). A resistência a produtos
288 cúpricos em bactérias fitopatogênicas foi observada pela primeira vez em *Xanthomonas*
289 spp. associadas com doenças em pimentão (Marco & Stall, 1983) e tem sido relatada

290 também em *Pseudomonas* spp. (Aguilar *et al.*, 2000). Com relação aos antibióticos,
291 diferenças na sensibilidade à estreptomicina foram observadas em *Xanthomonas* spp.
292 causando mancha-bacteriana do tomateiro na Flórida (Stall & Thayer, 1962), no Caribe e
293 na América Central (Bouzar *et al.*, 1999) enquanto que na Itália, onde o uso da
294 estreptomicina não é permitido, nenhum isolado resistente de *Xanthomonas* spp. do
295 pimentão foi detectado por Buonauro *et al.* (1994).

296 Não existem produtos registrados para podridão-mole em couve-chinesa. Apenas
297 Kasumim[®] e Mycoshield[®] são registrados para essa doença em cenoura e batata,
298 respectivamente, sendo também indicados para fitobacterioses em outras culturas (Lopes &
299 Quezado-Soares, 1997). Considerando os resultados e a classificação toxicológica da Agri-
300 Micina[®] (classe I – extremamente tóxica), o Mycoshield[®] (classe II – altamente tóxica) foi
301 selecionado para os experimentos posteriores.

302 Em casa de vegetação, nos dois experimentos realizados, o tratamento com
303 Mycoshield[®] a 1,5 g/L (50% da dosagem comercial, ou seja, 300 mg/L de oxitetraciclina)
304 não diferiu da testemunha em relação a nenhuma das variáveis analisadas, demonstrando
305 ineficácia no controle da doença (Tabela 3). Já o Mycoshield[®] na dosagem comercial,
306 apesar de não influenciar o PI em ambos os experimentos, promoveu reduções de 40,3 e
307 47,4% na SEVF da doença e de 19,0 e 11,4% no IDO em relação à testemunha não tratada.
308 Diferenças na AACPD foram observadas apenas no segundo experimento onde o
309 tratamento Mycoshield[®] 3,0 g/L reduziu esta variável em 55,0%. Esses resultados
310 confirmaram aqueles obtidos nos experimentos “in vitro”, onde a eficácia da oxitetraciclina
311 foi observada na inibição de Pcc (Tabela 2). De acordo com Theodoro & Maringoni,
312 (2000) apenas a oxitetraciclina foi capaz de reduzir a incidência do cancro-bacteriano do
313 tomateiro causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

314 No experimento em nervuras destacadas, os 10 isolados de leveduras testados não
315 influenciaram o PI. No entanto, os isolados Rh1, Rh2 (*Rhodotorula* sp.) e Sc1, 2658, 5107
316 (*S. cerevisiae*) reduziram a SEVF em até 84% (dados não apresentados), sendo os isolados
317 Rh1, Rh2 e Sc1 selecionados para o teste em casa de vegetação. “In vitro” as leveduras não
318 inibiram Pcc, indicando que não agem pelo mecanismo de antibiose.

319 Em casa de vegetação de modo geral não foi observada diferença significativa entre
320 tratamentos e testemunha para PI ou IDO nos dois experimentos (Tabela 4). No entanto, o
321 isolado Sc1 diferiu da testemunha em ambos os experimentos reduzindo a SEVF da doença
322 em até 27,6% e a AACPD em até 39,3%. O isolado Rh1 apenas reduziu a AACPD, nos
323 dois experimentos, em até 33,5%.

324 Em campo o Mycoshield[®] reduziu significativamente o IDO, a SEVF e a AACPD
325 em respectivamente 14,4; 15,5 e 28,9% comparado à testemunha, mas o nível de eficiência
326 foi considerado baixo. Os isolados de levedura também não apresentaram a eficiência
327 desejada. Apenas diferiram da testemunha, Rh1 que reduziu o IDO em 8,8% e Sc1 que
328 reduziu a AACPD em 15,7% (Tabela 5).

329 Dentre as diferentes medidas de controle da podridão-mole está o uso de
330 antibióticos ou fungicidas cúpricos (Zambolim *et al.*, 1997). No emprego de antibióticos, é
331 importante entre outros fatores considerar a eficiência do produto e o surgimento de
332 resistência, uma vez que, antibióticos podem tornar-se ineficazes pelo uso continuado dos
333 mesmos grupos químicos, com modos de ação semelhantes (Romeiro, 2005). Por se tratar
334 de uma folhosa, a couve-chinesa é consumida na maioria das vezes “in natura”. Portanto, a
335 utilização do controle químico deve ser inserida dentro de um programa de manejo
336 juntamente com outras medidas, levando-se em conta, sobretudo, o registro para a cultura e
337 o período de carência do produto utilizado.

338 Considerando que a couve-chinesa tem ciclo curto, de 60 a 70 dias, a fase crítica de
339 infecção ocorre próximo aos 20 dias após o transplante, ou seja 45 DAP, período em que as
340 folhas e, principalmente, as nervuras, tocam o solo e inicia-se a formação da cabeça. Neste
341 período, os tecidos da planta estão mais susceptíveis à ação das enzimas pectinolíticas
342 produzidas por Pcc, embora as perdas continuem nas fases de colheita, estocagem e
343 transporte (Ren *et al.*, 2001).

344 A baixa eficiência dos isolados de leveduras em campo podem ter resultado da
345 dificuldade de colonização do filoplano nas condições climáticas prevalentes neste habitat.
346 Apesar de excelentes competidoras por nutrientes, o que resulta em maior velocidade de
347 crescimento e capacidade de utilização dos substratos disponíveis (Gava,1998), a
348 colonização de determinado local pelas leveduras depende não só da disponibilidade
349 desses nutrientes e espaço, mas da microbiota e dos fatores ambientais existentes naquele
350 local. Assim sendo, os isolados de leveduras testados apresentam pouco potencial para o
351 controle da podridão-mole da couve-chinesa. Apesar de não agirem por antibiose e de
352 terem como possíveis mecanismos de ação a competição e/ou indução de resistência, os
353 índices de controle estão abaixo daqueles recomendados para um efetivo controle
354 biológico, mesmo inserido em um contexto de manejo. Também Gomes et al. (2005)
355 relataram que o controle da podridão-mole em tomate com o isolado de levedura LD-19
356 apresentou baixa eficiência, em torno de 20%. Por outro lado, reduções de incidência de
357 100% da podridão-mole foram obtidas em frutos de pimentão com os isolados P-5 de
358 *Pseudomonas* sp. fluorescente e LD-19 de *Rhodotorula* sp. (Melo *et al.*, 1995).

359 Considerando que a couve-chinesa é uma hortaliça folhosa, de ciclo curto, a
360 probabilidade do surgimento de resistência na população do patógeno e principalmente os
361 baixos níveis de redução da intensidade da doença obtidos pelo Mycoshield® e leveduras

362 em campo, conclui-se que ambos apresentaram baixa eficiência para o controle da
363 podridão-mole da couve-chinesa nestas condições.

364

365

366

AGRADECIMENTOS

367 Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro (Proc.
368 479.622/2004-3) e bolsas de iniciação científica, apoio técnico e produtividade em
369 pesquisa.

370

371

REFERÊNCIAS

372 AGUIAR L; KIMURA O; CASTILHO AMC; CASTILHO KSC; RIBEIRO RLD; AKIBA

373 F; CARMO MG. F. 2000. Resistência ao cobre em isolados nacionais de

374 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. *Agronomia* 34:78-

375 82.

376 BENELLI AIH; DENARDIN ND; FORCELINI CA. 2004. Ação do acibenzolar-S-metil

377 aplicado em tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitada por

378 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. *Fitopatologia Brasileira* 29:

379 263-267.

380 BOUZAR H; JONES JB; STALL FJ; LOUWS FJ; SCHNEIDER M; RADEMAKER

381 JLW; BRUIJN de; JACKSON LE. 1999. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* causing

382 bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America:

383 evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology* 89:328-

384 335.

- 385 BUONAURO R; STRAVATO VM; SCORTICHINI M. 1994. Characterization of
386 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annuum* L. in Italy. *Plant*
387 *Disease* 78:296-299.
- 388 DONG YH; ZHANG XF; XU JL; ZHANG LH. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis*
389 silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal
390 interference. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 954-960.
- 391 FLEGO D; PIRHONEN M; SAARILAHTI H; PALVA TK; TAPIO PE. 1997. Control of
392 virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora*.
393 *Molecular Microbiology* 25: 831-838.
- 394 FRAY RG.; THROUP JP; DAYKIN M; WALLACE A; WILLIAMS P; STEWART G
395 SAB; GRIERSON D. 1999. Plant genetically modified to produce *N*-acylhomoserine
396 lactones communicate with bacteria. *Nature Biotechnology* 17: 1017-1020.
- 397 GOMES AMA; SILVEIRA EB; MARIANO RLR. 2005. Tratamento pós-colheita com
398 cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. *Horticultura*
399 *Brasileira* 23:108-111.
- 400 KIKUMOTO T. 1980. Ecological aspects of soft rot bacteria. Report of the Institute for
401 Agricultural Research (Tohoku University) 31: 19-41.
- 402 LEITE JÚNIOR RP. 2000. Surviving with Citrus Canker in Brazil. Proceedings, 9th
403 *Congress of the International Society for Citriculture*. Orlando FL. p. 890-896.
- 404 LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. 1997. *Doenças bacterianas das hortaliças –*
405 *diagnose e controle*. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 70 p.
- 406 MÃE A; MONTESANO M; KOIV V; PALVA T. 2001. Transgenic plant producing the
407 bacterial pheromone *N*-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the
408 bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*,
409 14: 1035-1042.

- 410 MANEFIELD M; WELCH M; GIVSKOV M; SALMOND GPC; KJELLEBERG S. 2001.
411 Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem
412 antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen
413 *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiology Letters* 205: 131-138.
- 414 MARCO, G.M.; STALL, R.E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains
415 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant*
416 *Disease* 67:779-781.
- 417 MARIANO RLR, ASSIS SMP, SILVEIRA E.B; GOMES AMA. 2005. Substâncias
418 químicas para controle de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano, R.L.R. (Coord.)
419 *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: Editora Universitária. 111-113p.
- 420 McKINNEY RH. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat
421 seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26:195-218.
- 422 MELO RAG; MARIANO RLR; MICHEREFF SJ; MENEZES M; COELHO RSB. 1995.
423 Controle biológico da podridão-mole do pimentão (*Capsicum annum*) causada por
424 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Summa Phytopathologica* 21:206-212.
- 425 PÉROMBELON MCM. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of
426 pathogenesis. *Plant Pathology* 51: 1-12.
- 427 PÉROMBELON MCM; KELMAN A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual*
428 *Review of Phytopathology* 18: 361-387.
- 429 REN J; PETZOLDT R; DICKSON MH. 2001. Genetics and population improvement
430 resistance to bacterial soft rot chinese cabbage. *Euphytica* 117: 197-207.
- 431 ROMEIRO RS. 2005. *Bactérias fitopatogênicas*. 2 ed. Viçosa: Imprensa Universitária da
432 UFV, 283 p.

- 433 SHANER G; FINNEY RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of
434 slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*, Saint Paul, v.15, n. 2,
435 p.1051-1056.
- 436 SILVA AMF; MARIANO LR; MICHEREFF SJ; SILVEIRA EB; MEDEIROS FHV.
437 2005. Levantamento da intensidade da podridão-mole da alface e couve-chinesa em
438 Pernambuco. *Caatinga* 20: 84-83.
- 439 STALL RE; THAYER PL. 1962. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen
440 and control with streptomycin. *Plant Disease Reporter*, 46:389-392.
- 441 THEODORO GF; MARINGONI AC. 2000. Ação de produtos químicos in vitro e in vivo
442 sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal do cancro
443 bacteriano do tomateiro. *Scientia Agricola* 57: 439-443.
- 444 VALDEBENITO-SANHUEZA RMV. 2000. Leveduras para o biocontrole de
445 fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**.
446 Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000, p. 41-56.
- 447 ZAMBOLIM L; VALE FXR; COSTA H. 1997. *Controle integrado das doenças de*
448 *hortaliças*. 1 ed. Viçosa: Imprensa Universitária de UFV. 122 p.
- 449
- 450
- 451

452

TABELAS

453

454

455 **Tabela 1.** Reação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* a oxitetraciclina
 456 (O), estreptomicina (E) e sulfato de cobre (SC) e misturas de oxitetraciclina +
 457 estreptomicina (O+E), oxitetraciclina + sulfato de cobre (O+SC) e estreptomicina +
 458 sulfato de cobre (E+SC) em meio de cultura NYDA contendo 0,2 g/L dos bactericidas.
 459 UFRPE, Recife, PE, 2008.

Isolado ¹	Hospedeira							Isolado	Hospedeira							E+S C
	Local ²	O	E	SC	O+E	O+SC	E+SC		Local ²	O	E	SC	O+E	O+SC		
Pcc64	Cc/CSF	S ¹	S	R	S	S	R	Pcc26	A/VSA	S	S	R	S	S	R	
Pcc130	A/VSA	S	S	R	S	S	S	Pcc51	Cc/CSF	S	S	R	S	S	S	
Pcc93	A/VSA	S	S	R	S	S	R	Pcc19	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	
Pcc78	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	Pcc112	A/VSA	S	S	R	S	S	R	
Pcc43	Cc/CSF	S	S	R	S	S	S	Pcc2	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	
Pcc38	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	Pcc7	A/VSA	S	S	R	S	S	R	
Pcc5	Cc/CSF	S	S	R	S	S	S	Pcc27	A/VSA	S	S	R	S	S	R	
Pcc96	A/VSA	S	S	R	S	S	S	Pcc21	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	
Pcc33	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	Pcc127	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	
Pcc49	A/CG	S	S	R	S	S	R	Pcc61	A/VSA	S	S	R	S	S	R	
Pcc74	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	Pcc59	A/VSA	S	S	R	S	S	R	
Pcc84	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	Pcc37	A/VSA	S	S	R	S	S	R	
Pcc120	A/VSA	S	S	R	S	S	R	Pcc8	A/VSA	S	S	R	S	S	R	
Pcc67	Cc/CSF	S	S	R	S	S	S	Pcc42	Cc/CSF	S	S	R	S	S	S	
Pcc89	A/VSA	S	S	R	S	S	R	Pcc23	A/CG	S	S	R	S	S	R	
Pcc106	A/VSA	S	S	R	S	S	R	Pcc32	A/VSA	S	S	R	S	S	S	
Pcc13	A/CG	S	S	R	S	S	S	Pcc80	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	
Pcc34	Cc/CSF	S	S	R	S	S	S	Pcc46	Cc/CSF	S	S	R	S	S	R	
Pcc1	A/CG	S	S	R	S	S	R	Pcc20	Cc/CSF	S	S	R	S	S	S	
Pcc100	A/VSA	S	S	R	S	S	S	Pcc118	A/CG	S	S	R	S	S	R	

460 ¹Isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* considerados sensíveis (S) ou resistentes (R) aos bactericidas avaliados
 461 com base na presença de crescimento confluyente; ²Hospedeiras: A = alface; Cc = couve-chinesa; Municípios: CG = Chã
 462 Grande; CSF = Camocim de São Félix; VSA = Vitória de Santo Antão.

463

464

465

466 **Tabela 2.** Efeito “in vitro” de antibióticos sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp.
 467 *carotovorum* (Pcc) utilizando-se o método de antibiose em discos e avaliando-se pelo
 468 diâmetro médio dos halos de inibição. UFRPE, Recife, PE, 2008.

TRATAMENTO ¹	Diâmetro médio dos halos de inibição (cm) ²					
	Isolado					
	Pcc112 ³	Pcc84	Pcc78	Pcc120	Pcc46	Pcc118
Kasumin [®] (2,0 g L ⁻¹)	0,0 cA ⁴	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA
Agri-Micina [®] (3,0 g L ⁻¹)	1,4 bABC	1,1 bBC	1,2 bBC	1,2 bBC	1,5 bAB	1,1 bC
Mycoshield [®] (3,0 g L ⁻¹)	2,0 aB	2,2 aA	2,3 aA	1,9 aB	2,0 aB	2,0 aA

469 ¹Kasumin[®] (Arysta Lifescience[®]- casugamicina 2,0%), Agri-Micina[®] (Pfizer[®]- oxitetraciclina, 1,5%; sulfato de
 470 estreptomicina, 15%) e Mycoshield[®] (Pfizer[®] - oxitetraciclina, 20%); ²Diâmetro aferido 24 h após instalação do
 471 experimento. ³Alíquota de 3 mL da suspensão bacteriana 10⁹UFC/mL foi adicionada a 100 mL de meio NYDA
 472 fundente, o qual após homogeneização foi vertido em placas de Petri. Após solidificação discos de papel de filtro
 473 contendo as dosagens dos bactericidas foram colocados em quatro pontos equidistantes da placa. ⁴Média de quatro
 474 repetições; médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan (P≤0,05).

475

476

477 **Tabela 3.** Efeito de oxitetraciclina no controle da podridão-mole em couve-chinesa,
 478 avaliado pelos componentes epidemiológicos em casa de vegetação, Departamento de
 479 Agronomia, UFRPE, Recife, PE, 2008.

TRATAMENTO ¹	1º experimento				2º experimento			
	PI ²	IDO	SEVF	AACPD	PI ²	IDO	SEVF	AACPD
	(horas)				(horas)			
Mycoshield [®] (3,0 g L ⁻¹)	19,0 ³ a	15,0 b	3,4 b	7,5 a	20,5 ³ a	3,9 b	3,1 b	4,9 b
Mycoshield [®] (1,5 g L ⁻¹)	18,5 a	17,9 a	5,4 a	7,0 a	20,0 a	4,5 a	6,2 a	9,6 a
Testemunha	18,0 a	18,5 a	5,7 a	8,0 a	19,5 a	4,4 a	5,9 a	11,0 a
C.V.(%)	14,0	10,5	13,8	9,5	9,5	6,4	11,6	22,3

480 ¹Mycoshield[®] (Pfizer[®] - oxitetraciclina, 20%); ²PI- determinado pelo número de horas entre a inoculação e o surgimento
 481 dos sintomas da doença. Índice de doença; IDO- calculado de acordo com McKinney (1923); SEVF-determinada às 48h
 482 após a inoculação, estimada com o auxílio de escala descritiva (Ren et al., 2001); AACPD- calculada segundo (Shaner &
 483 Finney, 1977); ³Média de quatro repetições; médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan
 484 (P≤0,05).

485

486

487

488

489 **Tabela 4.** Efeito de leveduras no controle da podridão-mole em couve-chinesa, avaliado
 490 pelos componentes epidemiológicos em casa de vegetação, Departamento de Agronomia,
 491 UFRPE, Recife, PE, 2008.

TRATAMENTO ¹	1º experimento				2º experimento			
	PI ² (horas)	IDO	SEV	AACPD	PI (horas)	IDO	SEVF	AACPD
Rh1 - <i>Rhodotorula</i> spp.	21,2 a ³	50,3 ab	4,3 ab	11,5 bc	20,0 a	51,0 a	4,3 ab	12,5 b
Rh2 - <i>Rhodotorula</i> spp.	16,9 b	54,4 a	3,9 bc	14,6 ab	19,5 a	49,5b	3,7 bc	14,6 ab
Sc1 - <i>Saccharomyces</i>	21,0 a	46,6 b	3,4 c	9,9 c	21,0 a	52,5 ab	3,3 c	11,7 b
Testemunha	22,5 a	52,1 ab	4,7a	16,3 a	21,5 a	55,0 ab	4,5 a	18,8 a
C.V.(%)	7,8	6,8	8,3	8,1	10,0	8,5	10,9	8,4

492 ¹Em todos os tratamentos a concentração foi ajustada em câmara de Neubauer para 10⁸ cel/mL e aplicados 5mL por
 493 pulverização na segunda folha definitiva; ²PI- determinado pelo número de horas entre a inoculação e o surgimento dos
 494 sintomas da doença. Índice de doença; IDO- calculado de acordo com McKinney (1923); SEVF-determinada às 48h
 495 após a inoculação, estimada com o auxílio de escala descritiva (Ren et al., 2001); AACPD- calculada segundo (Shaner &
 496 Finney, 1977); ³Média de quatro repetições; médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan
 497 (P≤0,05).
 498

499 **Tabela 5.** Efeito de oxitetraciclina e leveduras no controle da podridão-mole em couve-
 500 chinesa, avaliado pelos componentes epidemiológicos em campo comercial, Camocim de
 501 São Félix, PE, 2008.

TRATAMENTO ¹	PI ² (horas)	IDO	SEVF	AACPD
Mycoshield® (3,0 g L ⁻¹)	19,4c	39,8b	3,8b	5,9c
Sc1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19,8 ³ bc	43,2ab	4,1ab	7,0b
Rh1 - <i>Rhodotorula</i> spp.	21,2a	42,4b	4,3ab	8,0a
Testemunha	20,8ab	46,5a	4,5a	8,3a
C.V. (%)	4,0	5,5	7,4	8,6

502 ¹Mycoshield® (Pfizer® - oxitetraciclina, 20%); a concentração das suspensões de Sc1 e Rh1 foi ajustada em
 503 câmara de Neubauer para 10⁸ cel/mL e aplicados 5mL por pulverização na segunda folha definitiva; ²PI-
 504 determinado pelo número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença. Índice de
 505 doença; IDO- calculado de acordo com McKinney (1923); SEVF- determinada às 48h após a inoculação,
 506 estimada com o auxílio de escala descritiva (Ren et al., 2001); AACPD- calculada segundo (Shaner & Finney,
 507 1977); ³Média de quatro repetições; médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de
 508 Duncan (P≤0,05).



Conclusões Gerais

CONCLUSÕES

- ü O crescimento “in vitro” de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) não foi inibido por acibenzolar-S-metil, Ecolife[®], Agro-Mos[®] e óxido de cálcio;
- ü A resistência induzida foi evidenciada pela ausência antibiose do ASM e Agro-Mos[®] contra o patógeno e pelo aumento de atividade das enzimas peroxidase e polifeniloxidase aos sete dias após a indução;
- ü Em campo, apenas o ASM confirmou os resultados de casa de vegetação reduzindo a intensidade da doença;
- ü Neste trabalho não houve custo fisiológico em condições de campo para as plantas com aplicação do ASM ou Agro-Mos[®];
- ü Quarenta isolados de Pcc apresentaram sensibilidade aos antibióticos oxitetraciclina e estreptomicina, bem como resistência ao sulfato de cobre;
- ü Seis isolados de Pcc foram significativamente mais inibidos por Mycoshield[®] do que por Agri-Micina[®], não sendo inibidos por Kasumin[®]
- ü Em casa de vegetação, o Mycoshield[®] reduziu a severidade da podridão-mole em 47,4%, mas em campo o produto apresentou apenas 15,5% de redução da doença;
- ü Em casa de vegetação, a levedura Sc1 reduziu a severidade final da doença e a área abaixo da curva de progresso da doença em até 27,6 e 39,3%, mas em campo reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença em apenas 15,7%.
- ü Ficou comprovada a agressividade de Pcc pois não houve redução da incidência da podridão-mole da couve-chinesa em nenhum dos experimentos.

Ü A redução da intensidade da doença e o baixo custo fisiológico da indução indicam a potencialidade do uso do ASM em um programa de manejo integrado da doença;

Ü O Mycoshield[®] e as leveduras testadas apresentaram baixa eficiência para o controle da doença em campo.