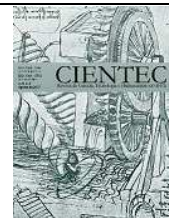




## Redução da podridão mole em couve-chinesa mediada por indutores de resistência

### Reduction of Chinese cabbage soft rot by resistance inducers

Submetido em 14.08.16 | Aceito em 19.01.17 | Disponível on-line em 29.12.17



Artigo

Marcelo Rodrigues Figueira de Mello \*

IFPE | \* marcelomello@barreiros.ifpe.edu.br

Elineide Barbosa Souza; Kedma Maria Silva Pinto; Marco Aurélio Siqueira da Gama e Rosa Lima Ramos Mariano | UFPE

#### RESUMO

A produção de couve-chinesa é limitada pela ocorrência da podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Foi avaliado o efeito de indutores de resistência no controle da doença, na atividade enzimática e no custo de indução para a planta. Acibenzolar-S-metil (ASM) (0,025 g L<sup>-1</sup>), Ecolife® (2 mL L<sup>-1</sup>), Agro-Mos® (2 mL L<sup>-1</sup>) e óxido de cálcio (0,22 g L<sup>-1</sup>) foram testados na inibição in vitro do isolado Pcc120 de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e no controle da podridão mole em casa de vegetação. O patógeno não foi inibido in vitro, o índice de doença foi reduzido em 35,1 e 45,3%, respectivamente por Agro-Mos® e ASM e a severidade final da doença foi reduzida em 47,5% por ambos. Plantas tratadas com ASM e Agro-Mos® foram avaliadas quanto à atividade enzimática, e estes produtos foram testados em campo quanto ao controle da doença e custo fisiológico da indução. A resistência induzida foi evidenciada pela ausência de antibiose dos dois produtos e pelo aumento da atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. Em campo, apenas o ASM confirmou os resultados de casa de vegetação reduzindo a intensidade da doença, e não houve custo fisiológico para as plantas tratadas com os dois produtos.

**Palavras-chaves:** *Brassica pekinensis*. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Indução de resistência. Enzimas

#### ABSTRACT

The production of Chinese cabbage is limited by the occurrence of soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. It was evaluated the effect of resistance inducers to control the disease, the enzymatic activity and physiological costs of induction for plants. Acibenzolar-S-methyl (ASM) (0.025 g L<sup>-1</sup>), Ecolife® (2 mL L<sup>-1</sup>), Agro-Mos® (2 mL L<sup>-1</sup>) and calcium oxide (0.22 g L<sup>-1</sup>) were tested for inhibition in vitro of isolate Pcc120 of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and control of soft rot under greenhouse conditions. The pathogen was not inhibited in vitro, the disease index was reduced by 35.1 and 45.3% respectively by Agro-Mos® and ASM and disease severity was reduced by 47.5% by both inducers. Plants treated with ASM and Agro-Mos® were evaluated for enzymatic activity, and these products were tested in field for disease control and physiological costs of induction. The induced resistance was evidenced by the absence of antibiosis of the two products and the increased activity of peroxidase and polyphenoloxidase. In field, only the ASM reduced the disease intensity, and both products had no physiological cost for the treated plants.

**Keywords:** *Brassica pekinensis*. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Induction of resistance. Enzymes

#### 1.Introdução

A podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* é uma doença de grande importância econômica para a cultura da couve-chinesa (*Brassica pekinensis* L.), uma vez que os sintomas de podridão nas folhas impedem a

comercialização do vegetal (GUERRA *et al.*, 2014). Levantamento epidemiológico realizado na Região Agreste do estado de Pernambuco em 2004 mostrou que a podridão mole em cultivos de couve-chinesa teve prevalência de 100% e incidência variando de 1 a 67%, evidenciando a importância da doença para essa hortaliça (SILVA *et al.*, 2007).

O controle da podridão mole é muito difícil, uma vez que *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* apresenta grande variabilidade (ALVARADO *et al.*, 2011), sobrevive por longos períodos em restos de cultura no solo, possui ampla gama de plantas hospedeiras (JUNG *et al.*, 2008; KOH *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012) e não existem agroquímicos eficientes para seu controle (SILVA *et al.*, 2012).

O uso de produtos comerciais que induzem resistência vem ganhando relevância no controle de doenças de plantas, a exemplo do acibenzolar-S-metil (ASM), Ecolife®, Agro-Mos® e cálcio. A indução de resistência consiste no tratamento da planta com agentes bióticos ou abióticos, ativando mecanismos locais ou sistêmicos de defesa que podem impedir a entrada ou a subsequente atividade de potenciais patógenos nos tecidos (METRÁUX, 2007).

O ASM é um composto sintético que induz respostas de defesa em plantas de forma semelhante ao ácido salicílico, sendo utilizado em campo na proteção contra um amplo espectro de doenças bacterianas em diversas espécies cultivadas (ABO-ELYOUSR; IBRAHIM; BALABEL, 2012; CAVALCANTI *et al.*, 2006; DU *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012). O Ecolife®, um produto comercial originado de biomassa cítrica, contendo em sua formulação polifenóis, flavonóides, fitoalexinas e ácidos orgânicos diluídos, tem se mostrado eficaz na proteção de doenças nas culturas do milho, pepino, cafeeiro e cacauzeiro (PUERARI *et al.*, 2015; RESENDE *et al.*, 2006). Dentre os ativadores naturais da planta ao ataque de patógenos, destaca-se o Agro-Mos®, um produto constituído à base de um mananoligossacarídeo fosforilado proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (CABRAL *et al.*, 2010; RESENDE *et al.*, 2006).

O cálcio é essencial na manutenção da integridade estrutural e funcional da parede celular, onde a proporção de pectatos de cálcio aumenta a resistência do tecido a infecções causadas por fungos e bactérias. Este macronutriente age também como indutor de resistência. A degradação dos pectatos é mediada por enzimas como as poligalacturonases, que

podem ser drasticamente inibidas pela alta concentração de cálcio nos tecidos da planta (MALAVOLTA, 2006; SUGIMOTO *et al.*, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Diversos mecanismos podem ser ativados durante o fenômeno de indução de resistência, entre os quais a ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR), como peroxidases,  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases e polifenoloxidasas (VAN LOON, 2006). Apesar das vantagens, a utilização de indutores de resistência pode requerer um custo fisiológico de adequação das plantas, que é o efeito negativo resultante da expressão da resistência, quando esta não é necessária, como na ausência de um patógeno. Se a energia é alocada para a proteção, em condições desfavoráveis à ocorrência da doença, a aplicação do indutor pode não ser recomendada (DIETRICH; PLOSS; HEIL, 2005).

Considerando a importância da podridão mole como fator limitante para a produção de couve-chinesa em Pernambuco, a dificuldade de medidas efetivas de controle para esta doença e a ausência de testes de indutores neste patossistema, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos indutores ASM, Ecolife®, Agro-Mos® e óxido de cálcio no controle da podridão mole causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em couve-chinesa, bem como, a atividade enzimática e o custo fisiológico da indução para a planta.

## 2. Material e métodos

O isolado de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc120) foi obtido da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, tendo sido oriundo de plantas de couve-chinesa com sintomas de podridão mole. Este isolado foi reativado em meio ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura (NYDA) (10 g glicose, 5 g extrato de levedura, 3 g extrato de carne, 5 g peptona bacteriológica e 20 g ágar L<sup>-1</sup>) e testado quanto à patogenicidade e virulência em plantas de couve-chinesa. Para utilização nos experimentos, o isolado foi cultivado em meio caseína ácido-peptona-glicose (CPG) (10 g caseína hidrolizada,

10 g peptona, 10 g glicose e 20 g ágar L<sup>-1</sup>) por 36 h, sendo a concentração da suspensão ajustada em espectrofotômetro (Analyser®, São Paulo, Brasil) para  $1,0 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Para avaliar o efeito dos indutores ASM (0,025 g L<sup>-1</sup>), Ecolife® (2 mL L<sup>-1</sup>), Agro-Mos® (2 mL L<sup>-1</sup>) e óxido de cálcio (0,22 g L<sup>-1</sup>) sob o crescimento *in vitro* de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* um teste de antibiograma foi conduzido usando discos, como descrito por Mariano e Souza (2016). Oxitetraciclina a 2,0% (3 g L<sup>-1</sup>) e água destilada esterilizada foram utilizados como testemunhas. A incubação foi feita a 29 °C durante 48 h e a avaliação foi realizada medindo-se os halos de inibição com o paquímetro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições, cada uma constituída por uma placa com cinco discos.

Em casa de vegetação da Área de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco foram realizados dois experimentos. No primeiro, os produtos foram testados para o controle da doença e no segundo, foi estudada a atividade enzimática induzida pelos produtos selecionados. Em ambos os experimentos, plantas de couve-chinesa cultivar AF-75 (Sakata Seeds South America, Bragança Paulista, Brasil) foram semeadas em bandejas com substrato Basaplant® (Base Agro Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) e aos 20 dias após plantio, transplantadas para vasos de plásticos de 3 L contendo solo:substrato (1:3, v:v). Sete dias após o transplante, ASM, Ecolife®, Agro-Mos® e óxido de cálcio foram aplicados por pulverização nas dosagens citadas anteriormente. Durante o período dos experimentos a temperatura média em casa de vegetação foi de  $27 \pm 3$  °C e  $72 \pm 8\%$ .

No primeiro experimento em casa de vegetação, aos sete dias após a aplicação dos indutores, as plantas com 34 dias de cultivo foram inoculadas, realizando-se um fermento com palito de dente esterilizado na base do pecíolo da segunda folha definitiva. No fermento, com o auxílio de um micropipetador, foram depositados 5 µL da suspensão de *Pcc120* com concentração de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Após a inoculação, as plantas foram submetidas à câmara úmida por 6 h,

utilizando sacos plásticos umedecidos com água. As avaliações foram realizadas inicialmente a cada hora durante as primeiras seis horas após a inoculação e, posteriormente, em intervalos de 6 h até completar 48 h de inoculação. As variáveis avaliadas foram: (a) incidência (INC), número de plantas doentes em relação ao total de plantas inoculadas; (b) período de incubação (PI), determinado pelo número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença; (c) severidade da doença (SEV) às 48 h após a inoculação, estimada com o auxílio de escala descritiva de 1 a 9, onde: 1 = sem lesão no ponto de inoculação; 2 = lesões menores que 5 mm; 3 = lesões entre 5 e 10 mm; 4 = lesões maiores que 10 mm, porém não atingindo as folhas; 5 = lesão alcançando o limbo foliar e o caule principal; 6 = caule infectado, porém sem atingir as folhas não inoculadas; 7 = caule e folhas não inoculadas infectadas; 8 = planta inteira próxima a morte; 9 = planta morta (REN; PETZOLDT; DICKSON, 2001); (d) índice de doença (IDO), calculado de acordo com McKinney (1923); e (e) área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), calculada conforme Shaner e Finney (1977).

No segundo experimento em casa de vegetação, foi avaliado o efeito dos produtos ASM e Agro-Mos® na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. O plantio e condução do experimento foram similares ao de seleção de produtos. A avaliação foi realizada 7 e 14 dias após a aplicação dos indutores nas dosagens já mencionadas, coletando-se uma folha de cada uma das quatro plantas de cada tratamento, as quais foram fragmentadas e homogeneizadas.

No preparo do extrato bruto enzimático, 2 g de folhas foram maceradas com nitrogênio líquido adicionando-se 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVP) e 4,0 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 5,0), contendo 1nM de EDTA. As amostras foram congeladas em freezer -20 °C durante 12 h e, após este período, centrifugadas a 14.000 rpm por 25 minutos (4 °C), transferindo-se o sobrenadante para novos tubos eppendorfs, armazenando-os a -20 °C para determinação do teor de proteínas totais e da

atividade enzimática. O teor de proteínas totais foi determinado de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976). A análise da atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7) foi realizada conforme protocolo descrito por Dann e Deverall (2000), enquanto que a da polifenoloxidase (EC 1.14.18.1) foi realizada de acordo com Campos *et al.* (2004).

Em casa de vegetação, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos no primeiro experimento (ASM, Ecolife®, Agro-Mos®, óxido de cálcio e testemunha) e três tratamentos no segundo (ASM, Agro-Mos® e testemunha). Todos com quatro repetições, cada uma constituída por um vaso com uma planta. As determinações analíticas das enzimas foram repetidas três vezes.

Em campo comercial, localizado no Município de Camocim de São Félix-PE, foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro para avaliar a eficiência dos indutores ASM e Agro-Mos® na redução da podridão mole e o segundo para avaliar o custo fisiológico da indução de resistência pelos dois indutores. Ambos os experimentos, foram conduzidos sob temperatura média de  $21 \pm 3$  °C e precipitação mensal de 55 mm. Os indutores foram aplicados conforme descrito para os experimentos em casa de vegetação. O plantio das sementes foi realizado em bandejas de poliestireno, contendo solo natural com textura areno-argilosa, sendo as mudas com 20 dias transplantadas para o campo, com espaçamento de 70 x 30 cm e irrigadas diariamente por gotejo. O patógeno foi inoculado apenas no primeiro experimento, conforme metodologia já descrita.

No primeiro experimento em campo (indução de resistência) foram avaliados INC, PI, SEV, IDO e AACPD, conforme descrito anteriormente. No segundo experimento (custo fisiológico), a avaliação foi realizada ao término do ciclo da cultura com 70 dias, observando-se a massa fresca da cabeça de couve-chinesa e a massa seca das raízes.

Em ambos os experimentos foi utilizado o delineamento em blocos inteiramente casualizados, com quatro blocos e três

tratamentos por bloco, incluindo a testemunha, cada tratamento constituído por dez plantas.

Todos os experimentos foram repetidos. Desde que não houve diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre as variâncias quando os experimentos foram replicados, os dados foram analisados conjuntamente. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SAEG® 9.0 (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Universidade Federal de Viçosa, 2005).

### 3. Resultados e discussão

Os indutores testados (ASM, Ecolife®, Agro-Mos® e óxido de cálcio) não inibiram o crescimento de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum in vitro*. Isto refuta a hipótese de proteção das plantas pela ação direta dos indutores sobre o patógeno, ou seja, antibiose. A ausência de atividade antibiótica *in vitro* é um dos critérios comumente utilizados para se distinguir resistência induzida de outros mecanismos de controle de doenças. Apesar de não existirem dados sobre a inibição de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* pelos indutores testados, sabe-se que óleos e extratos vegetais, possíveis indutores de resistência em couve-chinesa (GUERRA *et al.*, 2014) e alface crespa (SILVA *et al.*, 2012), também não inibiram *P. carotovorum* subsp. *carotovorum in vitro*. Silva, Pascholati e Bedendo (2007) também não observaram inibição significativa do crescimento *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* pelo ASM, porém Cavalcanti *et al.* (2006) demonstraram o efeito inibitório do Ecolife® sobre o crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*. Estas dessemelhanças de sensibilidade podem ser atribuídas a diferenças entre patógenos e isolados.

No primeiro experimento em casa de vegetação, realizado para avaliar potencial dos indutores no controle da doença, a INC foi de 100% em todos os tratamentos (dados não apresentados). Apenas o tratamento com Agro-Mos® aumentou significativamente ( $P \leq 0,05$ ) o PI,



sendo os primeiros sintomas detectados na base das folhas das plantas inoculadas 23,7 h após a inoculação, retardando o aparecimento da doença, que na testemunha ocorreu 15,6 h após a inoculação (Tabela 1). Os tratamentos com Agro-Mos® e ASM reduziram, respectivamente, o IDO em 35,1 e 45,3%, a AACPD em 65,4 e 51,5% e a SEV em 47,5%, para ambos os indutores, em relação à testemunha.

Não houve efeito significativo do óxido de cálcio e Ecolife® nas variáveis estudadas. O cálcio ligado a pectatos na lamela média é essencial para fortalecer a parede celular das plantas e a proporção de pectato de cálcio é importante para a resistência do tecido a infecções causadas por fungos e bactérias (MALAVOLTA, 2006; SUGIMOTO *et al.*, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2009). A ineficácia da ação do cálcio, isoladamente, pode estar relacionada com a fonte deste macronutriente e/ou com o teor inadequado de boro na planta. Por sua vez, o boro desempenha papel significativo para as brássicas, atuando na incorporação do cálcio na parede celular e na expansão celular, com efeito direto no crescimento e desenvolvimento dessas hortaliças (HAJIBOLAND; FARHANGHI; ALIASGHARPOUR, 2012; PIZETTA *et al.*, 2005). Não existem muitos estudos testando o Ecolife® contra doenças bacterianas. Este produto protegeu plantas de tomate contra a mancha bacteriana e induziu o aumento da atividade de

peroxidases e polifenoloxidasas, o acúmulo de lignina, além do efeito inibitório *in vitro* contra *X. vesicatoria* (CAVALCANTI *et al.*, 2006), discordando dos resultados aqui apresentados.

No segundo experimento em casa de vegetação, realizado para avaliar o efeito dos produtos ASM e Agro-Mos® na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, aos 7 dias após a aplicação dos produtos, apenas as plantas tratadas com ASM apresentaram diferenças significativas nas atividades de ambas as enzimas ( $P \leq 0,05$ ) em relação à testemunha (Tabela 2). Já aos 14 dias, plantas tratadas com os dois produtos evidenciaram atividades significativamente maiores ( $P \leq 0,05$ ) apenas para peroxidases. As peroxidases participam de processos como o fortalecimento da parede da célula hospedeira por oxidação de fenol, suberização e lignificação durante reações de defesa contra patógenos (SYROS *et al.*, 2004). Portanto, na maioria dos casos, um aumento na atividade das peroxidases é diretamente relacionado à diminuição da severidade da doença, e isso poderia ter acontecido neste estudo. Além disso, o prolongamento da atividade da peroxidases por 14 dias após a aplicação dos produtos coincide com o tempo necessário para o início da formação da cabeça de couve-chinesa no campo. Portanto, esta proteção ampliada, pode ser uma estratégia importante para o manejo da podridão mole desta folhosa.

**Tabela 1.** Controle da podridão mole em couve-chinesa tratada com Acibenzolar-S-metil (ASM), Ecolife®, Agro-Mos® e óxido de cálcio, avaliado por período de incubação (PI), severidade (SEV), índice de doença (IDO) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em condições de casa de vegetação

| Tratamentos <sup>1</sup>                       | PI <sup>2</sup> (h) | SEV   | IDO (%) | AACPD   |
|------------------------------------------------|---------------------|-------|---------|---------|
| Acibenzolar-S-metil (0,025 g L <sup>-1</sup> ) | 19,5 <sup>3</sup> b | 3,2 b | 35,5 b  | 35,5 b  |
| Ecolife® (2,0 g L <sup>-1</sup> )              | 17,7 b              | 5,8 a | 64,4 a  | 105,0 a |
| Óxido de cálcio (0,22 g L <sup>-1</sup> )      | 16,8 b              | 6,0 a | 66,6 a  | 93,4 ab |
| Agro-Mos® (2,0 g L <sup>-1</sup> )             | 23,7 a              | 3,2 b | 42,1 b  | 49,8 c  |
| Testemunha                                     | 15,6 b              | 6,1 a | 64,9 a  | 102,7 a |
| CV (%)                                         | 9,9                 | 5,7   | 8,5     | 19,9    |

<sup>1</sup>Indutores aplicados em plantas com 27 dias e inoculação com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* sete dias após indução; <sup>2</sup>PI= número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença; IDO= calculado de acordo com McKinney (1923); SEV= determinada às 48 h após a inoculação, com o auxílio da escala descritiva de Ren, Petzoldt e Dickson (2001); AACPD= calculada segundo Shaner e Finney (1977); <sup>3</sup>Média de oito repetições; médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, Teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )



**Tabela 2.** Atividade enzimática das peroxidases e polifenoloxidasas aos 7 e 14 dias após a aplicação de Acibenzolar-S-metil (ASM) e Agro-Mos® em couve-chinesa, em condições de casa de vegetação.

| Tratamento <sup>1</sup>         | 7 dias             |                    | 14 dias     |                    |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|-------------|--------------------|
|                                 | Peroxidasas        | Polifenol oxidasas | Peroxidasas | Polifenol oxidasas |
|                                 | (U/mg proteína)    |                    |             |                    |
| Acibenzolar-S-metil (0,025 g/L) | 7,1 <sup>2</sup> 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               |
| CV (%)                          | 16,5               | 28,1               | 42,5        | 15,7               |

<sup>1</sup>Indutores aplicados em plantas com 27 dias; <sup>2</sup>Média de oito repetições; médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, Teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

Plantas tratadas com ASM e Agro-Mos® não apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) em relação à testemunha quanto à atividade das polifenoloxidasas 14 dias após a aplicação dos produtos. Daí infere-se que nas condições do experimento, as polifenoloxidasas foram mais ativas 7 dias após o tratamento, enquanto as peroxidases tiveram ação mais prolongada. As polifenoloxidasas possuem a capacidade de oxidar compostos fenólicos para quinonas, substâncias tóxicas acumuladas após a infecção com ação antimicrobiana e barreira física, através da formação de complexos com proteínas relacionadas a patogênese (TAIZ; ZEIGER, 2009). Essas enzimas estão relacionadas com o processo de proteção antioxidativa catalisando a oxidação de componentes celulares como o peróxido de hidrogênio e também no aumento da síntese de lignina que fortalece a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas em abundância por alguns patógenos (SILVA *et al.*, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009). A maior atividade das peroxidases associadas ao ASM e Agro-Mos® e das polifenoloxidasas associadas ao ASM observadas neste trabalho resultaram em reforço da parede celular e podem estar associadas com indução de resistência local e sistêmica (CAVALCANTI *et al.*, 2006). Em plantas de cacaueiro, a pulverização com Agro-Mos® e ASM aumentou a expressão de genes que codificam polifenoloxidasas e quitinasas (PEREIRA, 2008). Aumento na atividade da POX e da PFO também foi relacionado com a maior resistência de tubérculos de batata a *Pectobacterium*

*atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e *Dickeya* spp (NGADZE *et al.*, 2011).

Em campo também não foi observada diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos com relação à INC que foi de 100%. O tratamento com ASM aumentou o PI (20,3 h) em relação à testemunha (19,2 h) (Tabela 3) e também reduziu o IDO e SEV em 13,0 e 19,0%, respectivamente. Os tratamentos ASM e Agro-Mos® reduziram a AACPD em 11,8 e 6,8%. Desta forma, os resultados do ASM no campo reproduziram os resultados obtidos em casa de vegetação, embora em menor escala, o que não aconteceu com o Agro-Mos® que apenas reduziu a AACPD.

Os produtos ASM e Agro-Mos® em casa de vegetação e ASM em campo, aplicados sete dias antes da inoculação com *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, reduziram a intensidade da podridão mole em plantas de couve-chinesa. Por se tratar de um patógeno com grande variabilidade (ALVARADO *et al.*, 2011) e de uma doença extremamente destrutiva, a podridão mole pode acarretar perdas relevantes na Região do Agreste de Pernambuco (SILVA *et al.*, 2007). Considerando que a couve-chinesa tem ciclo curto, de 60 a 70 dias, a fase crítica de infecção ocorre próximo aos 20 dias após o transplante, período em que as folhas e, principalmente as nervuras, tocam o solo e inicia-se a formação da cabeça. Neste período, os tecidos da planta estão mais susceptíveis à ação de enzimas pectinolíticas, embora as perdas continuem nas fases de colheita, estocagem e transporte (REN; PETZOLDT; DICKSON, 2001). Ponderando

ainda que o patógeno é extremamente agressivo, o retardamento da doença pelo produto ASM, demonstrado pelo aumento do PI e, a redução da intensidade da doença, representada pela diminuição da SEV, do IDO e da AACPD aos 20 dias de implantação da cultura, tornam-se extremamente importantes. Isto deverá restringir a doença às folhas mais velhas e evitar ou minimizar a infecção no caule da planta, desta forma possibilitando a colheita e comercialização do produto pelo agricultor, o que muito contribuirá para o manejo da doença.

Apesar de não terem sido encontrados na literatura consultada exemplos de controle da podridão mole em qualquer crucífera pelos indutores estudados, existem relatos de controle de doenças bacterianas em outras hortaliças. O ASM é um indutor de resistência amplamente reconhecido com efetividade de controle em tomateiro contra a mancha bacteriana (*X. vesicatoria*) (CAVALCANTI *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2012) a murcha bacteriana (*R. solanacearum*) (ABO-ELYOUSR; IBRAHIM; BALABEL, 2012) e a pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) (ANDRADE *et al.*, 2013).

Em campo, as variáveis biomassa fresca da cabeça e biomassa seca das raízes de couve-chinesa não diferiram ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos ASM (1,9 kg e 2,8 g), Agro-Mos® (1,8 kg e 2,9 g) e testemunha (1,8 kg e 2,3 g). Isso significa que não houve custo fisiológico da indução de resistência com a aplicação dos dois produtos, ou seja, ASM e Agro-Mos® não causaram perdas metabólicas, e os compostos destinados ao crescimento não foram utilizados para a defesa da planta (DIETRICH; PLOSS; HEIL, 2005; WALTERS; HEIL, 2007). Aplicações de ASM em tomateiros inoculados com *X. vesicatoria* não causaram custo fisiológico (CAVALCANTI *et al.*, 2006). Em contraposição, o uso do ASM em meloeiro visando o controle de *Acidovorax citrulli* alterou o metabolismo da planta, gerando custo metabólico traduzido por redução do crescimento (CABRAL *et al.*, 2010). Esta é uma das principais preocupações no uso de indutores de crescimento, levando até a exclusão do uso de produtos em espécies ou interações indutor/espécie que apresentam alto custo fisiológico. Portanto, este resultado significa que mesmo ocorrendo indução da resistência, a couve-chinesa não apresenta redução de crescimento.

**Tabela 3.** Controle da podridão mole em couve-chinesa tratada com Acibenzolar-S-metil (ASM) e Agro-Mos® avaliado por período de incubação (PI), índice de doença (IDO), severidade (SEV) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em campo comercial

| Tratamento <sup>1</sup>                        | PI <sup>2</sup> (h) | SEV  | IDO (%) (%) | AACPD |
|------------------------------------------------|---------------------|------|-------------|-------|
| Acibenzolar-S-metil (0,025 g L <sup>-1</sup> ) | 20,3 <sup>3</sup> a | 3,4b | 38,8b       | 70,5a |
| Agro-Mos® (2,0 g L <sup>-1</sup> )             | 18,8b               | 4,0a | 44,6a       | 74,5a |
| Testemunha                                     | 19,2b               | 4,2a | 44,6a       | 80,0b |
| CV (%)                                         | 5,4                 | 7,9  | 9,4         | 13,9  |

<sup>1</sup>Indutores aplicados em plantas com 27 dias e inoculação com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* sete dias após indução; <sup>2</sup>PI= número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da doença; IDO= calculado de acordo com McKinney (1923); SEV= determinada às 48 h após a inoculação, com o auxílio da escala descritiva de Ren, Petzoldt e Dickson (2001); AACPD= calculada segundo Shaner e Finney (1977); <sup>3</sup>Média de quatro repetições; médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, Teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

#### 4. Conclusões

1. ASM, Ecolife®, Agro-Mos® e óxido de cálcio não têm efeito direto sobre *P. carotovorum*

subsp. *carotovorum*, pois não inibem seu crescimento *in vitro*;

2. A resistência induzida foi evidenciada pela ausência de 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;

3. Em campo, apenas o ASM confirmou os resultados de casa de vegetação reduzindo a intensidade da doença;

4. Não houve custo fisiológico para as plantas com a aplicação do ASM ou Agro-Mos® em condições de campo.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE pelo financiamento (APQ-0583-5.01/08) e pela concessão da bolsa de Mestrado ao autor. Os autores também agradecem ao CNPq pela concessão das bolsas de produtividade em pesquisa, em especial o Proc. 302625/2005-4.

## 6. Referências

- ABO-ELYOUSR, K. A. M.; IBRAHIM, Y.E.; BALABEL, N. M. Induction of disease defensive enzymes in response to treatment with acibenzolar-S-methyl (ASM) and *Pseudomonas fluorescens* Pf2 and inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 (phylotype II). **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 382-389, 2012.
- ALVARADO, I. C. M. *et al.* Characterization and variability of soft root-causing bacteria in Chinese cabbage in North Eastern Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, n. 1, p. 173-181, 2011.
- CAMILA, C. L.; ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; MARIANO, R. L. R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 028-034, 2013
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 248-254, 1976.
- CAMPOS, A. D. *et al.* Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão a antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.
- CAVALCANTI, F. R. *et al.* Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 372-380, 2006.
- DANN, E. K.; DEVERALL, B. J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, v. 49, n. 3, p. 324-332, 2000.
- DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, n. 2, p. 211-222, 2005.
- DU, Q.; ZHU, W.; ZHAO, Z.; QIAN, X.; XU, Y. NOVEL. benzo-1,2,3-thiadiazole-7-carboxylate derivatives as plant activators and the development of their agricultural applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 346-353, 2012.
- GUERRA, M. L. *et al.* Essential plant oils in reducing the intensity of soft rot in Chinese cabbage. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 4, 760-766, 2014
- HAJIBOLAND, R.; FARHANGHI, F.; ALIASGHARPOUR, M. Morphological and anatomical modifications in leaf, stem and roots of four plant species under boron deficiency conditions. **Anales de Biología**, v. 34, p. 15-29, 2012
- HUANG, C-H.; VALLAD, G. E.; ZHANG, S.; WEN, A.; BALOGH, B.; FIGUEIREDO, J. F. L.; BEHLAU, F.; JONES, J. B.; MOMOL, M. T.; OLSON, S. M. Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against

- bacterial spot on tomato. **Plant Disease**, v. 96, p. 221-227, 2012.
- JUNG, Y. J.; CHOI, C. S.; PARK, J. H.; KANG, H. W.; CHOI, J. E.; NOU, ILL-SUP; LEE, Y. S. Overexpression of the pineapple fruit bromelain gene (BAA) in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa*) results in enhanced resistance to bacterial soft rot. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.2225/vol10-issue4-fulltext-5>
- KOH, Y. J.; PARK, J. I.; AHMED, N. U.; JUNG, H. J.; KANG, K. K.; HUR, Y.; LIM, Y. P.; NOU, Ill-Sup. Enhancement of resistance to soft rot (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) in transgenic *Brassica rapa*. **European Journal of Plant Pathology** v. 136, p. 317-322. 2013.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631p.
- MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. Manual de práticas em fitobacteriologia. 3. ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2016. 225 p.
- MCKINNEY, R. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, n. 9, p. 195-218, 1923.
- Metráux, J. P. Induced defense in plants. In: Rodrigues, F. A.; Romeiro, R. S (Ed.) **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV, 2007. p. 7-24.
- PEREIRA, L. M. **Expressão Quantitativa de Genes Relacionados à Defesa Induzida em *Theobroma cacao* por Bion® e Agro-Mos® contra *Crinipellis pernicios***. 2008. 52f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- PIZETTA, L. C. *et al.* Resposta de brócolis, couve-flor e repolho à adubação com boro em solo arenoso. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 51-56, 2005.
- NGADZE, E.; ICISHAHAYO, D.; COUTINHO, T. A.; VAN DER WAALS, J.E. The role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and total soluble phenols in the resistance of potatoes to soft rot. **Plant Disease**, v. 96, p. 186-192, 2011.
- PUERARI, H. H.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; CARDOSO, M. R.; HERNANDES, I.; BRITO, O. D. C.; COSTA, O. D. Resistance inducers in the control of root lesion nematodes in resistant and susceptible cultivars of maize. **Phytoparasitica**, V. 43, N. 3, P. 383-389, 2015.
- REN, J.; PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Genetics and population improvement resistance to bacterial soft rot Chinese cabbage. *Euphytica*, v. 117, n. 3, p. 197-207, 2001.
- RESENDE, M. L. V. *et al.* Produtos indutores à base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.14, p. 363-382, 2006.
- SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v. 15, n. 8, p. 1051-1056, 1977.
- SILVA, M. C. *et al.* Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 29-38. 2008.
- SILVA, A. M. F. *et al.* Levantamento da intensidade da podridão-mole da alface e couve-chinesa em Pernambuco. **Caatinga**, v. 20, n. 2, p. 84-83, 2007.
- SILVA, C. L. *et al.* Óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão mole em alface crespa. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 632-638, 2012.

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**, v. 32, n. 3, p.189-196, 2007.

SUGIMOTO, T.; WATANABE, K.; YOSHIDA, S.; AINO, M.; FURIKI, M.; SHIONO M. Field application of calcium to reduce Phytophthora stem rot of soybean, and calcium distribution in plants. **Plant Disease**, v. 94, n. 7, p. 812-819, 2010.

SYROS, T. *et al.* Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 1, p. 69-77, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-62, 2006.

WALTERS, D.; HEIL, M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, p. 3-17, 2007.