



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

MANEJO DA PODRIDÃO MOLE EM COUVE-CHINESA E ALFACE

Kátia Cilene da Silva Felix

**Recife-PE
Dezembro-2012**

KÁTIA CILENE DA SILVA FELIX

**MANEJO DA PODRIDÃO MOLE EM
COUVE-CHINESA E ALFACE**

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

Recife-PE

Dezembro-2012

Manejo da podridão mole em couve-chinesa e alface

KÁTIA CILENE DA SILVA FELIX

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof^ª. Dr^ª. Elineide Barbosa de Souza – Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Rosa de Lima Ramos Mariano – Co-orientadora

Recife-PE

Dezembro-2012

Ficha catalográfica

F316m Felix, Kátia Cilene da Silva
Manejo da podridão mole em couve-chinesa e alface / Kátia
Cilene da Silva Felix. – Recife, 2012
83 p. : il.

Orientadora: Elineide Barbosa de Souza.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2012.
Referências.

1. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 2. Cálcio
3. *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* 4. Ultraestrutura 5. *Lactuca*
sativa 6. Resistência genética 7. Manejo I. Souza, Elineide Barbosa
de, orientadora II. Título

CDD 632

MANEJO DA PODRIDÃO-MOLE EM COUVE-CHINESA E ALFACE

KÁTIA CILENE DA SILVA FELIX

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 27 de Dezembro de 2012.

ORIENTADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Elineide Barbosa de Souza

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dr^ª. Andréa Maria André Gomes - UNINASSAU

Dr. Roberto de Albuquerque Melo – UFRPE

Dr^ª. Janaína Cortez de Oliveira - UFRPE

Prof^ª. Dr^ª. Sônia Maria de Oliveira - UFRPE

**RECIFE-PE
Dezembro, 2012**

*"Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca
me levei realmente a sério.
É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas,...
Mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros,
Mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."*

Cora Coralina

Aos meus queridos irmãos, Karine Felix Militão, Kleber Felix, Kleriston Felix e Maria Felix, ao meu cunhado Haroldo Militão, meu sobrinho amado Murilo e meus tios e avôs, pelo apoio, incentivo, amor e compreensão em todos os momentos.

OFEREÇO

Aos verdadeiros amores da minha vida, meus pais José Felix Dão e Rosimeire da Silva Felix, pelo exemplo de vida, caráter, dedicação e amor, a quem sempre tiveram como prioridade os estudos dos seus filhos, meu eterno agradecimento.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela formação acadêmica oferecida, por todo acolhimento, serviços prestados e estrutura cedida para estudos, pesquisas e demais atividades.

Às Professoras Dra. Elineide Barbosa de Souza e Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano, pelo empenho, atenção, dedicação, amizade, orientação acadêmica e valiosos ensinamentos, que muito contribuíram para minha formação profissional.

Ao Departamento de Agronomia da UFRPE, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação.

Aos professores que compõem o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE, pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso.

À Professora Dra. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel, pela valiosa colaboração e disponibilidade durante a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo;

Meu grande agradecimento à toda equipe que compõe o Laboratório de Fitobacteriologia (LAFBAC), Aldenir Alves, Adriano Márcio, Christianno Rollemberg, Conrado Queiroz, Claudeana Souza, Edilaine Melo, Greecy Mirian, Mirtis Midiam, Ivanise Viana, Liliana Santos, Luciana Omega, Luydson Jamyson, Marcos Araújo, Marco Aurélio, Myrzânia Guerra e Tássia Camila, pela valiosa ajuda em todos os momentos durante a execução deste trabalho;

Aos amigos, Antonio Neto, Carine Naue, Cléia Cabral, Conrado Queiroz, Cristiane Lima, Christianno Rollemberg, Erika Graciano, Erlen Candido, Emerson Lins, Gustavo Melo, Hailson Alves, Janaína Oliveira, Joyce Lima, Josicléda Galvíncio, Kirley Marques, Marília Marques, Leonardo Tavares, Nelson Lima, Ricardo Vasconcelos, Sarah Cavalcanti e Willams Oliveira minha imensa gratidão, pelo companheirismo de todos os momentos dessa trajetória, amizade e toda força recebida;

À Darcy Martins, Romildo Angeiras e Adelmo Adriane, pela amizade e presteza, ao longo do curso;

A Luiz Coelho (Lula) e ao Sr. Luís pelo apoio na realização dos experimentos executados em casa de vegetação.

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

Sumário

RESUMO GERAL	xi
GENERAL ABSTRACT	xiii
Capítulo I	14
Introdução Geral	14
INTRODUÇÃO GERAL	15
Aspectos gerais das culturas couve-chinesa e alface	15
Podridão mole.....	18
Controle mediado pelo uso de cálcio.....	21
Resistência genética	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
Capítulo II	37
REDUÇÃO DA SEVERIDADE DA PODRIDÃO MOLE EM COUVE-CHINESA MEDIADA PELO CÁLCIO	37
RESUMO	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS	40
Obtenção e identificação do isolado de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	40
Redução da severidade da podridão mole em couve-chinesa mediada pelo cálcio.....	41
Análise do tecido vegetal de couve-chinesa para conteúdo de cálcio	43
Análise de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão em tecido foliar de couve-chinesa.....	43
Análises estatísticas	44
RESULTADOS	44
Obtenção e identificação do isolado de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	44
Redução da severidade da podridão mole em couve-chinesa mediada pelo cálcio e análise do tecido vegetal e conteúdo de cálcio.....	45
Análise de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão em tecido foliar de couve-chinesa.....	46
DISCUSSÃO	47
AGRADECIMENTOS	51
REFERÊNCIAS	52
Capítulo II	64

SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACE COM FONTE DE RESISTÊNCIA À PODRIDÃO MOLE	65
RESUMO.....	65
INTRODUÇÃO	65
MATERIAL E MÉTODOS	67
Obtenção dos isolados de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	67
Seleção de genótipos de alface resistentes à podridão mole	68
Análise da estabilidade da resistência de genótipos de alface à podridão mole.....	69
RESULTADOS	69
Seleção de genótipos de alface resistentes à podridão mole	69
Análise da estabilidade da resistência de genótipos de alface à podridão mole.....	70
DISCUSSÃO	71
AGRADECIMENTOS	74
REFERÊNCIAS.....	74
CONCLUSÕES GERAIS	83

RESUMO GERAL

A podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* é a principal fitobacteriose das culturas da couve-chinesa e alface no Brasil e mundo. O controle químico dessa doença não tem sido eficiente, sendo necessária a busca por novas alternativas de controle. Tendo em vista a crescente importância da podridão mole como fator limitante para a produção destas hortaliças nas mesorregiões do Agreste e Mata do estado de Pernambuco, Brasil e a dificuldade de medidas efetivas de controle, o presente trabalho teve como objetivos: (i) verificar o efeito do cálcio no controle da podridão mole em couve-chinesa; (ii) selecionar cultivares de alface como fontes de resistência à podridão mole. Foram testadas duas fontes de cálcio em diferentes concentrações, nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) a 0,00; 0,15 e 0,3 g L^{-1} e cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,00; 1 e 5 g L^{-1} , aplicadas via pulverização foliar e rega do solo. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, nas duas formas de aplicação foi eficiente no controle da podridão mole, reduzindo a severidade da doença em até 48,5% via aplicação foliar (0,15 g L^{-1}). Verificou-se aumento significativo do conteúdo de cálcio foliar apenas nas plantas pulverizadas com as maiores doses de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 . Em todos os tratamentos com cálcio, a microscopia de luz revelou aumento do número de cloroplastos e melhor estruturação do parênquima paliádico, enquanto a microscopia eletrônica de transmissão evidenciou aumento de espessura da parede celular, com destaque para o tratamento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 0,15 g L^{-1} via pulverização foliar e rega do solo. De acordo com os resultados obtidos, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 0,15 e 0,3 g L^{-1} , aplicado via pulverização foliar e rega do solo, apresentou potencial para o controle da podridão mole em plantas de couve-chinesa, estando essa eficiência associada a melhor estruturação e integridade da parede celular. Dos 41 genótipos de alface avaliados quanto à reação à podridão mole, visando identificar fontes de resistência, 14 apresentaram reação como moderadamente resistentes, com severidade variando de 3,5 a 4,0, enquanto 27 genótipos foram suscetíveis. Destes genótipos, 11 foram selecionados para o ensaio de estabilidade da resistência em relação a três isolados do patógeno com diferentes níveis de virulência, sendo quatro suscetíveis e sete moderadamente resistentes. A maioria dos genótipos avaliados (77%) voltou a expressar a mesma reação do ensaio de seleção em relação ao isolado Pcc-36, ou seja, reação susceptível (Veneza Roxa) e moderadamente resistente (Alface Grega, Mimosa Salad Bowl Roxa, Livia, Livinia, Salad Bowl, Vitória de Santo

Antão e Saia Veia). Apenas o genótipo Vitória de Santo Antão manteve a reação de moderadamente resistente também para os isolados Pcc-A1.1 e Pcc-23. Portanto, esse genótipo pode ser utilizado como uma fonte promissora de resistência estável e durável contra a podridão mole.

Palavras-chaves: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, cálcio, *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*, ultraestrutura, *Lactuca sativa*, resistência genética e manejo.

GENERAL ABSTRACT

The soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* is the main bacterial disease of Chinese cabbage and lettuce in Brazil and the world. Chemical control of this disease has not been efficient, being necessary to search for new alternatives of control. Given the growing importance of soft rot as a limiting factor for the production of these vegetables in the regions of the Agreste and Mata of Pernambuco state, Brazil and the difficulty of effective control measures, the present study aimed to: (i) determine the effect Calcium in the control of soft rot in Chinese cabbage, (ii) select lettuce cultivars as promising sources of resistance to soft rot. Were tested two sources of calcium in different concentrations, calcium nitrate [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] a 0.00; 0.15 and 0.3 g L⁻¹ and calcium chloride [CaCl_2] a 0.00; 1 and 5 g L⁻¹ applied leaf spraying and soil drench. When applied with both methods, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ was effective in controlling soft rot, as it reduced the disease severity by up to 48.5% when sprayed onto the leaves (0.15 g L⁻¹). A significant increase in the leaf calcium content was observed only in the plants that were sprayed with higher doses of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and CaCl_2 . In all of the calcium treatments, light microscopy analyses revealed an increased number of chloroplasts and improved structuring of the palisade parenchyma, while transmission electron microscopy analyses revealed an increased cell wall thickness that was especially evident for the 0.15 g L⁻¹ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ treatment applied by leaf spraying and soil drenching. Of the 41 genotypes tested, 14 were moderately resistant when inoculated with Pcc-C, with severity scores ranging from 3.5 to 4.0; 27 genotypes were susceptible. Eleven of these genotypes, four susceptible and seven moderately resistant were selected to test their resistance stability against three pathogen isolates with different degrees of virulence (Pcc-36, Pcc-A1.1 and Pcc-23). Most of the genotypes evaluated (77%) exhibited the same reaction observed in the selection assays only against isolate Pcc-36: Veneza Roxa was susceptible, while Alface Grega, Mimosa Salad Bowl Roxa, Livia, Livinia, Salad Bowl, Vitória de Santo Antão and Saia Veia were moderately resistant. Vitória de Santo Antão was the only genotype that was also moderately resistant to isolates Pcc-A1.1 and Pcc-23. This genotype can be used as a promising source of stable and durable soft rot resistance.

Keywords: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, calcium, *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*, ultrastructure, *Lactuca sativa*, genetic resistance and control.

Capítulo I

Introdução Geral

MANEJO DA PODRIDÃO-MOLE EM COUVE-CHINESA E ALFACE

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos gerais das culturas couve-chinesa e alface

Em 2010 a produção mundial de hortaliças folhosas ficou em torno de 90 milhões de toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO, 2010). No Brasil, a produção desse segmento horticola aumentou em 63% entre os anos de 1990 e 2006, chegando a 779 mil toneladas em 2007, numa área plantada de 771 mil hectares (GUTIERREZ, 2010). O cultivo de hortaliças gera 2,4 milhões de empregos diretos, ou seja, 3,5 empregos por hectare (MAPA, 2011).

Dados de informações atualizadas sobre a produção de hortaliças folhosas no Brasil são escassos. Entre as hortaliças produzidas no estado de Pernambuco, o cultivo da couve-chinesa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) e alface (*Lactuca sativa* L.) tem se destacado pela expressiva importância econômica. Em 2011, segundo informações da Central de Abastecimento de Pernambuco (CEASA-PE, 2012) foram comercializados 135 toneladas de couve-chinesa e 127 toneladas de alface, sendo Camocim de São Félix, Chã Grande, Garanhuns, Bonito, São Joaquim do Monte e Gravatá os principais municípios produtores de couve-chinesa e Vitória de Santo Antão, de alface.

A safra de couve-chinesa ocorre de janeiro a maio, onde existe uma oferta de produtos de melhor qualidade e, por conseguinte preços mais baixos (CEASA-PE, 2012). A busca por preços mais atrativos faz com que parte dos agricultores cultive a couve-chinesa no período chuvoso, época favorável à ocorrência de doenças (MELLO, 2009). O cultivo da alface, hortaliça de maior importância econômica para o Brasil, se dá em todas as regiões, cujo cultivo se caracteriza pela produção intensiva, em pequenas áreas e por produtores familiares, gerando cerca de cinco empregos diretos por hectare (COSTA; SALA, 2005).

A couve-chinesa pertence à família Brassicaceae originária da China, onde se acredita ter surgido a partir do cruzamento entre o repolho chinês (*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis*) e nabo (*Brassica rapa* L. var. *rapa*). Existem duas formas principais de couve-chinesa que se diferencia basicamente pelo tamanho e tipo de cabeça, sendo o

tipo Napa curto e largo e o tipo Michihili mais longo e afilado (BURT; PHILLIPS; GATTER, 2006). Essa cultura também é conhecida como acelga (FILGUEIRA, 2000).

A alface, pertencente à família Asteraceae (Compositae), é nativa da bacia do Mediterrâneo sendo uma das espécies botânicas mais antigas. Algumas evidências demonstram que sua domesticação ocorreu a partir da espécie selvagem *L. serriola* L. (JAGGER et al., 1941; VRIES, 1997). A introdução na Europa Ocidental foi no início do século XV, e alguns tipos de alface como a lisa, batávia e romana já tinham sido descritas. A cultura foi introduzida na América possivelmente em 1494 (RYDER, 2002), pelas expedições de Cristovão Colombo para o Novo Mundo e, no Brasil, sua introdução se deu pelos portugueses em 1950 (SALA; COSTA, 2012). É a principal folhosa consumida em salada pela população brasileira, tanto pelo sabor e qualidade nutricional quanto pelo reduzido preço para o consumidor (LOPES; QUEZADO-DUVAL; REIS, 2010; RESENDE et al., 2007).

É uma planta herbácea, com caule curto, não ramificado, ao qual se prendem as folhas que são relativamente grandes. Estas podem ser lisas ou crespas, formando ou não “cabeça”, a coloração das folhas variam em tons de verde a verde-amarelada, ou roxa, conforme a cultivar. Considerando-se as características das folhas e a formação ou não de cabeça, segundo Filgueira (2008), as cultivares de alface podem ser agrupadas em seis tipos ou segmentos: **tipo Repolhuda-Crespa ou Americana** - as folhas são caracteristicamente crespas, bem consistentes e com nervuras destacadas, formando uma cabeça compacta. As folhas internas são mais crocantes que as externas, sendo preferidas para sanduíches. As cultivares Tainá, Lucy Brown, Raider Plus e Rafaela são exemplos desse tipo de alface; **tipo Repolhuda Lisa (“manteiga”)** - as folhas são bem mais lisas, de coloração verde amarelada e aspecto amanteigado, formando uma típica cabeça compacta, como observado nas cultivares White Boston, Carolina, Elisa e Lídia; **tipo Solta Lisa** - as folhas são mais macias, lisas e soltas, não havendo formação de cabeça, a exemplo das cultivares Babá de Verão, Regina, Luisa e Vitória de Santo Antão; **tipo Solta Crespa** - folhas consistentes, crespas e soltas, não formando cabeça. Folhas com superfície inteiramente irregular, com as bordas onduladas. São representantes desse tipo as cultivares Verônica, Vera, Mônica e Vanda; **tipo Mimosa** - as folhas são delicadas e com aspecto arrepiado, como encontrado nas cultivares: Red Salad Bowl, Salad Bowl e Mimosa. É um tipo recente que vem adquirindo certa relevância; **tipo Romana** - as folhas são alongadas e consistentes, com nervuras bem

protuberantes, formando cabeças fofas. Apresenta grande demanda para processamento e na produção de “mix” de folhas, bastante utilizadas por restaurantes.

O mercado consumidor brasileiro até meados dos anos 80 tinha preferência pela alface White Boston, tipo Repolhuda Lisa “manteiga”. Com o desenvolvimento de variedades, posteriormente houve uma migração para o segmento de alface crespa tipo Solta Crespa, cuja aceitação se deve ao fato de não formar cabeça e ter folhas flabeladas que facilita o manuseio e transporte durante a comercialização (COSTA; SALA, 2005). Na alfacultura mundial, a preferência brasileira pela alface crespa é um fato único. No entanto, a alface tipo Americana vem mostrando crescentes índices de aceitação pelo mercado consumidor. Apesar da sua característica de formação de cabeça ter limitado seu cultivo no verão, exceto em condições de cultivo protegido, suas folhas são mais espessas o que pode conferir melhor sabor, crocância e durabilidade pós-colheita (SALA; COSTA, 2012).

A diversificação da alface contribui para o aumento de seu consumo, além de ser uma importante forma de agregar valor. As cultivares distintas permitem atender a diferentes tipos de mercados consumidores, com variadas exigências e diferentes níveis financeiros. Tudo isso acontecendo junto, permite o aumento do consumo de alface (COSTA; SALA, 2005; SALA; COSTA, 2008; SILVA, 2009). Além disso, a evolução dos sistemas de manejo, tratamentos culturais, irrigação, espaçamentos, técnicas de colheita e de conservação pós-colheita, e mudanças nos hábitos alimentares impulsionaram o cultivo e tornou a alface a hortaliça folhosa mais consumida no país (REZENDE et al., 2007).

A alface é cultivada em diferentes épocas e regiões, em diversas condições edafoclimáticas. O estabelecimento da cultura pode ser feito por meio de semeadura direta no campo ou por transplante, após a produção de mudas. Nos dois casos, as condições edafoclimáticas poderão influenciar no estabelecimento da lavoura e, conseqüentemente, na produtividade e lucro do produtor (NASCIMENTO, 2002).

Assim como outras hortaliças, a couve-chinesa e a alface podem ser afetadas por diferentes pragas e doenças. Dentre as de origem bacterianas, se destaca a podridão mole.

Podridão mole

A podridão mole em couve-chinesa e alface, causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al. (Sin, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Smith), é mencionada como a mais destrutiva e preocupante doença em muitas áreas produtoras no Brasil e no mundo (RAID, 1997; VANJILDORJ et al., 2009). Pode reduzir significativamente a produção no campo, ocorrendo desde a fase de pré-colheita até a comercialização (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). De acordo com um levantamento publicado por Mansfield et al. (2012), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* está entre as dez fitobacterioses de maior importância científica e econômica do mundo.

As perdas econômicas causadas pela podridão mole são grandes, variando com o valor da cultura e época de plantio, severidade do ataque, condições ambientais e das práticas aplicadas do cultivo à comercialização dos produtos (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Em 2004, na mesorregião Agreste do estado de Pernambuco, foi constatada prevalência de 100% da podridão mole em couve-chinesa e de 42,9% em alface, num total de 42 áreas amostradas, com incidência variando entre 1 a 67% para couve-chinesa e 0 a 22% em alface (SILVA et al., 2007).

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* está alocada no Filo Proteobacteria, Classe Gamaproteobacteria, Ordem Enterobacteriales, Família Enterobacteriaceae e Gênero *Pectobacterium*. As espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Pectobacterium* são gram-negativas, anaeróbicos facultativos, baciliforme, móveis. Em meio de cultura têm crescimento ótimo entre 28-30° C, formam colônias pigmentadas de coloração creme, opacas, circulares ou amebóides, com bordos irregulares e de aproximadamente 1,5 a 3,0 mm de diâmetro (JABUONSKI; TAKATSU; REIFSCHNEIDER, 1986).

Espécies de *Pectobacterium* são comumente denominadas de pectobactérias porque são produtoras de enzimas pectinolíticas que causam inicialmente encharcamento ou anasarca, sendo responsáveis pelo sintoma de podridão mole (MARINGONI, 1997). Essas bactérias dependem em grande parte da temperatura, umidade e concentração de oxigênio para iniciar a infecção, bem como para a produção e intensidade dos sintomas (PÉROMBELON; KELMAN, 1980).

Os sintomas causados por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em campo resulta em colapso generalizado da planta, o que é favorecido por condições de temperatura e

umidade elevadas (KADO, 2010). Em couve-chinesa ocorrem inicialmente na base das folhas em contato com o solo infestado, progredindo rapidamente para o caule principal, resultando no colapso de toda a planta (REN; PETZOLDT; DICKSON, 2001). Em alface, a maceração dos tecidos surge inicialmente como uma murcha nas folhas externas, sendo as plantas adultas (próximo à idade da colheita) mais suscetíveis. A murcha é causada pelo colapso dos tecidos vasculares, resultando na descoloração do tecido. Com o progresso da doença, a medula do caule torna-se encharcada, macerada e esverdeada (Figura 1). Em estádios avançados, toda a planta pode apodrecer, inclusive no período pós-colheita (RAID, 1997).



Figura 1. Sintomas de podridão mole em plantas de couve-chinesa (A-C) e alface (D-F).

Para que haja sucesso na infecção é requerida a produção e secreção coordenada de diferentes fatores de virulência pela bactéria. As enzimas pectinolíticas (pectina metil esterase, pectina liase, pectina acetil esterase, pectato liase, poligalacturonases, celulases e proteases) degradadoras da parede celular da planta hospedeira (plant cell wall degrading enzymes - PCWDEs) são comumente os principais determinantes da virulência. A produção dessas enzimas extracelulares é controlada pela densidade

celular (dependente), através da sinalização molecular (N-acil-homoserina lactona - AHLs) mais conhecido como quorum-sensing. Além das PCWDEs, vários outros fatores e mecanismos, tais como a motilidade, produção de lipopolissacarídeos, exopolissacarídeos, harpins e outras proteínas efetoras, toxinas, sideróforos, condições ambientais e o hospedeiro, contribuem para o desenvolvimento da doença (BARRAS; van GIJSEGEM; CHATTERJEE, 1994; KADO, 2010; KERSEY; AGYEMANG; DUMENYO, 2012; PÉROMBELON, 2002; TOTH et al 2003; TOTH; PRITCHARD; BIRCH, 2006). Hossain et al. (2005) verificaram que mutantes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* sem motilidade apresentavam redução na produção de enzimas e na severidade da doença em couve-chinesa.

A bactéria penetra na planta através de ferimentos ou aberturas naturais, localizando-se nos espaços intercelulares dos tecidos parenquimatosos e eventualmente no tecido vascular (PÉROMBELON, 2002; PÉROMBELON; KELMAN, 1980), no qual se multiplicam produzindo as enzimas pectinolíticas que atuam na lamela média. O tecido afetado se desintegra em uma massa pastosa de células desorganizadas rodeadas por bactérias e suas enzimas, ocasionando o sintoma de podridão mole. A maceração do tecido vegetal é resultante da perda de componentes da parede celular e liberação de fluidos celulares (KADO, 2010). Yang; Cramer e Lacy (1992) verificaram que as enzimas endopectato liase, exopectato liase e endopoligalacturonase foram produzidas sequencialmente até as 12 primeiras horas após a inoculação de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em tubérculos de batata, revelando sua agressividade e importância para a patogênese.

O patógeno tem capacidade de sobreviver no hospedeiro ou dissociada dele, na superfície de plantas como epifíticos e/ou endofíticos, bem como saprófitas no solo (PÉROMBELON, 2002), se disseminando pela água de irrigação (MADDOX; HARRISON, 1988), insetos (KLOEPPER; HARRISON; BREWER, 1979), movimento de solo, tratos culturais, implementos agrícolas (PÉROMBELON; KELMAN, 1980), e sementes (HADAS et al., 2001), entre outros, tornando mais difícil seu controle.

Existem registros de quatro formulados comerciais contendo antibióticos de uso agrícola, a Agri-Micina[®] (oxitetraciclina 1,5% + estreptomicina 15%), Agrimaicin[®] 500 (oxitetraciclina 3% + sulfato de cobre 40%), Kasumin[®] (casugamicina 2,0%), e Mycoshield[®] (oxitetraciclina 2,0%) (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997). No entanto,

segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012), nenhum produto é registrado para o controle da doença em couve-chinesa e alface.

As principais medidas recomendadas para o controle da podridão mole incluem: evitar plantio em solos de baixada e mal drenados; erradicar plantas doentes; destruir restos culturais; rotação de culturas por três a quatro anos; não armazenar produtos doentes e sadios conjuntamente; armazenar produtos em local ventilado, seco e frio; evitar fermentos durante tratamentos culturais; controlar insetos mastigadores; desinfestar depósitos e armazéns com sulfato de cobre; utilizar água de boa qualidade para irrigação livre de contaminação; evitar o excesso de umidade com o maior espaçamento possível entre plantas; efetuar adubação equilibrada e rica em cálcio e utilizar cloro na água de lavagem (MARIANO et al., 2001).

Alguns pesquisadores recomendam ainda, o controle biológico (DONG et al., 2004; MANEFIELD et al., 2001), uso de indutores de resistência (BENELLI; DENARDIN; FORCELINI, 2004), aplicação de cálcio (FLEGO et al., 1997) e uso de variedades resistentes (REN; PETCOLDT; DICKSON, 2001) ou plantas transgênicas (FRAY et al., 1999; MÃE et al., 2001). No entanto, Ren et al. (2001) consideram que o controle da podridão mole é dificultado pela ampla gama de plantas hospedeiras e pela capacidade da bactéria em sobreviver de em restos de cultura no solo.

Outro fator importante que dificulta o controle da doença é a alta variabilidade do patógeno. A grande diversidade de hortaliças cultivadas nas áreas de produção de couve-chinesa e alface, assim como plantas daninhas presentes na região que podem ser hospedeiras alternativa da bactéria, podem contribuir como mecanismo de variabilidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (ALVARADO et al., 2011).

Controle mediado pelo uso de cálcio

O controle cultural pelo uso de cálcio (Ca) tem sido utilizado em inúmeros trabalhos com sucesso para o controle de diversas doenças, tanto na pré quanto na pós-colheita (CONWAY et al., 1992; GOMES; SILVEIRA; MARIANO, 2005; HAJHAMED et al., 2007; McGUIRE; KELMAN, 1986; SUGIMOTO et al., 2010).

O cálcio é um macronutriente essencial para a planta com papel importante na integridade estrutural das membranas e da parede celular (DAYOD et al., 2010) e atua como um mensageiro secundário para inúmeros sinais ambientais (bióticos e abióticos) e hormonais das plantas (LECOURIEUX; RANJEVA; PUGIN, 2006). Esse elemento

(Ca) encontra-se mais proeminente no apoplasto, espaço da parede celular onde desempenha pelo menos duas funções distintas: interligar cadeias pécnicas com o elemento boro, contribuindo conseqüentemente para a estabilidade da parede e a formação do gel pécnico (EPSTEIN; BLOOM, 2006). A necessidade de cálcio é específica para cada espécie vegetal, variando entre 0,1 a 5,0% do peso seco, dependendo das condições de crescimento (MARSCHNER, 1995). A deficiência desse elemento pode causar prejuízo imediato à planta, como distúrbios fisiológicos (EPSTEIN; BLOOM, 2006). Em couve-chinesa, o conteúdo de cálcio nas folhas é em torno de 54 mg Ca 100 g⁻¹ do peso fresco (FOOD STANDARDS AGENCY, 2002).

O cálcio é absorvido pela planta por meio da solução do solo na forma divalente (Ca²⁺) e move-se com a água, sendo sua translocação via apoplástica e seu teor nos tecidos está sujeito às taxas de transpiração, no qual o fluxo de água (transpiração) carrega íons de cálcio das raízes para as folhas, via xilema, sendo distribuído apoplasticamente para o interior da parede celular (CONN et al., 2011). Na formação da parede celular resíduos de ácido galacturônico (pectina) são secretados como metil ésteres, os quais sofrem um processo de deesterificação pela enzima pectina metilesterase, liberando um grupo carboxílico que se liga ao íon de cálcio presente no apoplasto, onde se encontra a maior parte deste (HEPLER, 2005; SATTELMACHER, 2001). Uma vez depositado, o cálcio não apresenta redistribuição para outras partes da planta, sendo acumulado principalmente em tecidos que transpiram mais facilmente (MILLAWAY; WIERSHOLM, 1979). Devido à distribuição intracelular diferencial do cálcio, a concentração de cálcio livre (Ca²⁺) no citoplasma é rigidamente controlada (WHITE; BROADLEY, 2003).

Além da parede celular, o cálcio é encontrado em altas concentrações em outros compartimentos intracelulares, como vacúolo, retículo endoplasmático, mitocôndrias, cloroplastos, e em baixas concentrações no citoplasma (DOYOD et al., 2010). A concentração de íons de cálcio no citoplasma está acima de 0,1 µM e regula diversos processos, incluindo a secreção de componentes da parede celular. Já na parede celular a concentração de íons de cálcio é cerca de 10 µM a 10 mM, liga-se a cargas negativas sobre as pectinas e confere rigidez estrutural à parede. A membrana plasmática ocupa uma posição central entre os dois compartimentos, em que os canais seletivos regulam o influxo de íons de cálcio e os transportadores específicos bombeiam íon do citoplasma de volta para a parede celular (HEPLER; WINSHIP, 2010). O acúmulo e, ou

concentração de íons de cálcio na parede celular varia grandemente com o tipo de tecido e condições ambientais (SATTELMACHER, 2001), e diferentes tipos de célula respondem diferentemente ao cálcio extracelular (DAYOD et al., 2010).

Storey e Leigh (2004) estudando a distribuição de cálcio em folhas de limoeiro (*Citrus jambhiri* Lush.) usando microanálise de raio-X, observaram que o cálcio se acumulou em diferentes tecidos principalmente nos tecidos do parênquima paliçádico e esponjoso, havendo também formação de cristais nas células idioblásticas, evidenciando a importância desses tecidos como reservatórios de cálcio, sendo sua distribuição referente a taxa de absorção em diferentes tecidos. A redução na capacidade de acumular cálcio no mesófilo de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. resultou numa diminuição da extensão da parede celular, abertura estomática, transpiração, assimilação de CO₂, e taxa de crescimento foliar. Por outro lado, foi verificado um aumento na transcrição de outros genes responsáveis pelo transporte de íons de cálcio, alteração na expressão de proteínas modificadas da parede celular, como das famílias da pectina-metil-esterase, expansina, celulose síntase e poligalacturonase, concentrações mais elevadas de pectina e paredes celulares mais espessas (CONN et al., 2011). Estudos de ultra-estrutura conduzidos durante os últimos anos, utilizando microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio-X, contribuíram para a compreensão das diferentes células e organelas que acumulam íons de cálcio (HEPLER; WINSHIP, 2010; SATTELMACHER, 2001; WHITE; BROADLEY, 2003). Proporcionando assim um maior entendimento da complexidade entre as ligações, transporte e armazenamento do cálcio nas plantas (DOYOD et al., 2010).

Diversos trabalhos têm indicado os efeitos benéficos do cálcio na fisiologia da planta e por consequência na prevenção de doenças (bióticas e abióticas), relacionando cloreto de cálcio (CaCl₂) e nitrato de cálcio [Ca(NO₃)₂] como as principais fontes de cálcio utilizadas (DAYOD et al., 2010; LIANG; WANG; AI, 2009; McGUIRE; KELMAN, 1986; SEN et al., 2010; SUGIMOTO et al., 2010).

Schober e Vermeulen (1999) observaram que o uso de CaCl₂ ocasionou uma resistência parcial da podridão mole em chicória, sendo atribuída essa redução ao cálcio pelo retardamento da atividade do fator primário de patogenicidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. As enzimas pectato liase e poligalacturonase, foram detectadas apenas as 24 e 48h após a inoculação do patógeno, respectivamente. Ngadze (2012) verificou uma redução da podridão mole e canela preta em tubérculos e plantas de

batata, pela aplicação de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, também associada a interferência do cálcio na ação das enzimas pectato liase e poligalacturonases. Em couve-chinesa, apenas um trabalho realizado na China relatou a eficiência do cálcio no controle da podridão mole (PARK, 1969). No Brasil, estudos sobre o efeito desse elemento no controle da doença em couve-chinesa não foi encontrado na literatura consultada.

Resistência genética

A resistência genética é definida como a capacidade de algumas espécies de plantas têm em suprimir, reduzir ou retardar as injúrias e danos causados por patógenos. A resistência é caracterizada pela sua natureza dinâmica e coordenada, onde a efetividade depende da expressão dos seus mecanismos em uma sequência lógica, após o contato do patógeno com o hospedeiro. Mostra-se como um sistema multicomponente, onde o nível de resistência resulta da somatória das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

O uso de cultivares resistentes a doenças tem sido sem dúvida o método de controle mais eficiente, sendo uma das principais práticas de sustentabilidade da agricultura moderna. Essa técnica é, ao mesmo tempo, o meio mais eficiente, econômico e seguro do ponto de vista ambiental, por reduzir o uso de agroquímicos, sendo compatível com outras práticas de manejo de doenças de plantas (CAMARGO, 2011b). No entanto, a obtenção de genótipos resistentes a doenças é um trabalho árduo do ponto de vista de se gerar e manter o genótipo resistente. Isto ocorre devido às estratégias desenvolvidas pelos patógenos, onde estes apresentam algumas vantagens seletivas sobre o genótipo hospedeiro, entre elas estão o rápido ciclo de vida e a facilidade de liberação de novas combinações genéticas de patogenicidade, principalmente devido aos mecanismos de variabilidade genética, como mutação e recombinação (MATTIELO; BARBEIRI; CARVALHO, 1997).

A busca por cultivares resistentes consiste num trabalho de grande complexidade, no qual estratégias de melhoramento devem ser traçadas. Para isso é necessário que se identifique fontes de resistência, que posteriormente serão cruzadas com cultivares de interesse, para transferência dessa resistência (LIMA; ASSUNÇÃO; VALLE, 2005). A identificação de cultivares resistentes, produtivos, dotados de outros bons atributos agrônômicos é o objetivo dos programas de melhoramento genético de qualquer espécie cultivada (BORÉM; MIRANDA, 2005).

Na identificação de fontes de resistência, podem-se utilizar métodos de inoculações artificiais em condições controladas ou realizar experimentos em áreas que apresentem longo histórico de infecção, avaliando-se a resistência de diversos acessos com base na incidência e, ou severidade da doença, comparando-se com o comportamento de cultivares suscetíveis. Outra etapa indispensável é verificar se essa resistência é durável, pois muitos agentes patogênicos apresentam variabilidade genética que diferem em agressividade, em diferentes cultivares de uma cultura. Assim, a resistência depende tanto do genótipo do hospedeiro como da variante do patógeno, ambos afetados pelo ambiente. Por isso, o conhecimento da variabilidade genética do patógeno é pré-requisito para um teste rigoroso e inteligente na seleção de materiais resistentes (LIMA, 2005).

De acordo com Camargo (2011a), a resistência do hospedeiro pode ser qualitativa ou quantitativa. De forma epidemiológica, resistência qualitativa é sinônimo de resistência vertical - caracteriza-se quando uma cultivar é resistente a alguma(s) raça(s) do patógeno, neste caso ocorre interação diferencial entre cultivares do hospedeiro e raças do patógeno. Já a resistência quantitativa é sinônimo de resistência horizontal, também denominada resistência de campo ou não específica, sendo controlada por muitos genes (poligênica), que se complementam, o que se admite como um fator de maior estabilidade, não ocorrendo uma interação diferencial entre cultivares do hospedeiro e raças do patógeno (VANDERPLANK, 1968).

A natureza da resistência qualitativa baseia-se na percepção, ou seja, no reconhecimento do patógeno, que ocorre no momento do estabelecimento da relação patógeno-hospedeiro, onde uma série de eventos celulares coordenados pela expressão de genes de resistência (genes "R") desencadeia o reconhecimento do patógeno pela planta, interferindo no processo de infecção, resultando na ausência de sintomas. Entretanto, se o patógeno conseguir suplantar o sistema de reconhecimento da planta conferido pelo gene R (ou infectar uma planta sem gene R), então ele conseguirá se estabelecer e colonizar a planta em maior ou menor grau, caracterizando a resistência quantitativa. A diferença nos níveis de resistência quantitativa entre as plantas é devido às constituições alélicas dos vários genes envolvidos na resposta da planta ao patógeno, que é traduzido em maior ou menor quantidade de doença (CAMARGO, 2011b).

Algumas pesquisas tem sido conduzidas para obtenção de cultivares resistentes ou tolerantes a podridão mole, a exemplo de couve-chinesa, pela transgenia

(VANJILDORJ et al., 2009), de batata (*Solanum tuberosum* L.) por meio de seleção de cultivares (BENELLI; DENARDIN; FORCELINI, 2004; VITALE et al., 2004), e de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) por seleção de genótipos (HENZ; REIFSCHNEIDER; SANTOS, 2005). No entanto, nenhum relato sobre genótipos de alface resistentes a podridão mole foi encontrado.

A busca por cultivares de alface resistente a podridão mole é importante, entretanto torna-se mais difícil porque *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* é um patógeno que sobrevive no solo, tem ampla gama de hospedeiros e alta variabilidade genética. Alvarado et al. (2011) estudando uma população dessa bactéria oriunda de couve-chinesa de várias áreas de cultivo no estado de Pernambuco, constataram uma alta variabilidade, reafirmando a importância de se testar vários isolados em estudos de seleção de cultivares.

Tendo em vista a crescente importância da podridão mole como fator limitante para a produção de couve-chinesa e alface no Agreste do estado de Pernambuco e a dificuldade de medidas efetivas de controle para a doença, o presente trabalho teve como objetivos: (i) verificar o efeito de cálcio no controle da podridão mole em couve-chinesa; (ii) selecionar cultivares de alface promissoras como fontes de resistência à podridão mole.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARADO, I. C. M.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; RESENDE, L. V.; CARDOSO, E.; MIZUBUTI, E. S. G. Characterization and variability of soft rot-causing bacteria in chinese cabbage in north eastern Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 93, n. 1, p. 173-181, 2011.

BARRAS, F.; VAN GIJSEGEM, F.; CHATTERJEE, A. K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 201-234, 1994.

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.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 525 p.

BURT, J.; PHILLIPS, D.; GATTER, D. **Growing Chinese cabbage in Western Australia**. South Perth: Department of Agriculture, 2006. Disponível em: <http://www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported_assets/content/hort/veg/cp/asianveg/bulletin4673.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2012.

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. Princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011a. v. 1, p. 119-132.

CAMARGO, L. E. A. Controle Genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. Princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011b. v. 1, p. 325-340.

CENTRAL DE ABASTECIMENTO DE PERNAMBUCO. **Comercialização de produtos**. Recife: Central de Abastecimento de Pernambuco, 2012. Disponível em: <<http://www.ceasape.org.br/calend.php>>. Acesso em: 03 set. 2012.

CONN, S. J.; GILLIHAM, M.; ATHMAN, A.; SCHREIBER, A. W.; BAUMANN, U.; MOLLER, I.; CHENG, N. H.; STANCOMBE, M. A.; HIRSCHI, K. D.; WEBB, A. A. R.; BURTON, R.; KAISER, B. N.; TYERMAN, S. D.; LEIGH, R. A. Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockeville, v. 23, n. 1, p. 240-257, 2011.

CONWAY, W. S.; SAMS, C. E.; McGUIRE, R. G.; KELMAN, A. Calcium treatment of apples and potatoes to reduce post-harvest decay. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 4, p. 329-334, 1992.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, 2005.

DAYOD, M.; TYERMAN, S. D.; LEIGH, R. A.; GILLIHAM, M. Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification. **Protoplasma**, New York, v. 247, n. 3-4, p. 215-231, 2010

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.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p

FILGUEIRA, F. A. R. Asteráceas. Alface e outras folhosas. In: FILGUEIRA, F. A. R. (ed.) **Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna para produção de hortaliças**. 3. ed.. Viçosa: UFV, 2008. p. 300- 306.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

FAOSTAT 2010. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 03 ago. 2012.

FOOD STANDARDS AGENCY. **CoF IDS 2002**. McCance and Widdowson's the composition of foods, 6th Summary edn. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2002. Disponível em:

<<http://tna.europarchive.org/20110116113217/http://www.food.gov.uk/science/dietarysurveys/dietsurveys/>>. Acesso em: 27 set. 2012.

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.

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.

GUTIERREZ, A. S. D. **Hortaliças em números: novidades no mercado – Frutas e Hortaliças frescas**. São Paulo: Centro de Qualidade e Hortaliças – CEAGESP, 2010. Disponível em:

<http://www.hortibrasil.org.br/jnw/index.php?option=com_content&view=article&id=9>

09:hortalicas-em-numeros&catid=64:frutas-e-hortalicas-frescas&Itemid=82>. Acesso em: 11 ago. 2012.

HADAS, R.; KRITZMAN, G.; GEFEN, T.; MANULIS, S. Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* contaminating pepper seeds. **Plant Pathology**, British, v. 50, n. 1, p. 117-123, 2001.

HAJHAMED, A. A.; EL-SAYED, W. M. A.; EL-YAZIED, A. A.; EL-GHAFFAR, N. Y. A.; Suppression of bacterial soft rot disease of potato. **Egyptian Journal Phytopathology**, Giza, 35:69-80, 2007.

HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; SANTOS, F. F. Reaction of arracacha genotypes to the root soft rot caused by *Pectobacterium chrysanthemi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 1, p. 95-98, 2005.

HEPLER, P. K. Calcium: a central regulator of plant growth and development. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 8, p. 2142–2155, 2005.

HEPLER, P. K.; WINSHIP, L. J. Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. **Journal of Integrative Plant Biology**, Malden, v. 52, n. 2, p. 147–160, 2010.

HOSSAÍN, M. M.; SHIBATA, S.; AIZAWA, S. I.; TSUYUMU, S. Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, n. 4, p. 134-143, 2005.

JABUONSKI, R. E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 185-195, 1986.

JAGGER, I. C.; WHITAKER, T. W.; USELMAN, J. J.; OWEN, W. M. **The Imperial strains of lettuce**. Washington: United States Department of Agriculture, 1941. 15p. (Circular, 596).

KADO, C. I. **Plant Bacteriology**. Saint Paul: APS Press, 2010. 336p.

KERSEY, C. M.; AGYEMANG, P. A.; DUMENYO, C. K. CorA, the magnesium/nickel/cobalt transporter, affects virulence and extracellular enzyme production in the soft rot pathogen *Pectobacterium carotovorum*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, n. 1, p. 58–71, 2012.

KLOEPPER, J. W.; HARRISON, M. D.; BREWER, J. W. The association of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* var. *carotovora* with insects in Colorado. **American Potato Journal**, Orono, v. 56, p. 351-361, 1979.

LECOURIEUX, D.; RANJEVA, R.; PUGIN, A. Calcium in plant defence-signalling Pathways. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, n. 2, p. 249–269, 2006.

LIANG, W.; WANG, M.; AI, X. The role of calcium in regulating photosynthesis and related physiological indexes of cucumber seedlings under low light intensity and suboptimal temperature stress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n. 123, n. 1, p. 34–38, 2009.

LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; VALLE, L. A. C. Controle genético de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE. Imprensa Universitária, 2005, p. 247-278.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa Hortaliças (CNPq), 1997. 70p.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças (CNPq), 2010. 68p.

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.

MADDOX, D. A.; HARRISON, M. D. Presence and population dynamics of *Erwinia carotovora* in irrigation water in South Central Colorado. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 64, p. 169-182, 1988.

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.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, v. 6, p. 614-629, 2012.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, I. S.; NASCIMENTO, A. R. P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste Brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.) **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, 2001, p. 141-169.

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.

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

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

McGUIRE, R. G.; KELMAN, A. Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 401-406, 1986.

MELLO, M. R. F. **Eficiência de indutores e antibióticos no controle da podridão mole em couve-chinesa**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

MELLO, M. R. F.; SILVEIRA, E. B.; VIANA, I. O.; GUERRA, M. L.; MARIANO, R. L. R. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 78-83, 2011.

MILLAWAY, R. M.; WIERSHOLM, L. Calcium and methabolic disorders. **Communications of Soil Science Plant and Analysis**, New York, v. 10, p. 1-28, 1979.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012. Disponível em:<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 16 nov. 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Câmara Setoriais e Temáticos**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Hortalicas/Dados_Economicos/ABCSEM%202011.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2012.

NASCIMENTO, W. M. **Germinação de sementes de alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2002. 10p. (Circular Técnica, 29).

NGADZE, E. **Identification and control of potato soft rot and blackleg pathogens in Zimbabwe**. 2012, 165f. Tese (Doutorado em Patologia de plantas). University of Pretoria, Pretoria, 2012.

PARK, S. K. Studies in the relationship between Ca nutrient and soft rot disease in Chinese cabbage. **Research Report to Rural Development Administration**, Suwon, v. 12, p.63-70, 1969.

PASCHOLATTI, S. F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, p.417-453.
PÉROMBELON, M. C. M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of pathogenesis. **Plant Pathology**, Oxford, v, 51, n, 1, p. 1-12, 2002.

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

RAID, R. N. Soft rot of lettuce. In: Davis, R. M.; SUBBARAO, K. V.; RAID, R. N.; KURTZ, E. A. (Eds.) **Compendium of lettuce diseases**. St. Paul: APS Press, 1997. p. 30-31.

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

RESENDE, F. V.; SAMINÊZ, T. C. O.; VIDAL, M. C.; SOUZA, R. B.; CLEMENTE, F. M V. **Cultivo de alface em sistema orgânico de produção**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 16p. (Circular Técnica, 56).

RYDER, E. J. **The new salad crop revolution**. Alexandria: ASHS Press, 2002.
Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/v5-408.html>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

SALA, F. C. A; COSTA, C. P. 'GLORIOSA': cultivar de alface crespa americana tropicalizada. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 409-410, 2008.

- SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.
- SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**, Cambridge, v. 149, n. 22, p. 167–172, 2001.
- SCHOBER, B. M.; VERMEULEN, T. Enzymatic maceration of witloof chicory by the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the effect of nitrogen and calcium treatments of the plant on pectic enzyme production and disease development. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 4, p. 341–349, 1999.
- SEN, F.; KARACALI, I.; IRGET, M. E.; ELMACI, O. L.; TEPECIK, M. A new strategy to enrich calcium nutrition of fruit: synergistic effects of postharvest foliar calcium and boron sprays. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 33, n.2, p. 175–184, 2010.
- SILVA, E. C. Anita: cultivar de alface de verão para cultivo protegido no solo e em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 260-262. 2009.
- SILVA, A. M. F.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; SILVEIRA, E. B.; MEDEIROS, F. H. V. Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface E couve-chinesa em Pernambuco. **Caatinga**, Mossoró, v.20, n.2, p. 84-93, 2007.
- STOREY, R.; LEIGH, R. A. Processes modulating calcium distribution in citrus leaves. An investigation using X-Ray microanalysis with strontium as a tracer. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 136, n. 3, p. 3838-3848, 2004.
- SUGIMOTO, T.; WATANABE, K.; YOSHIDA, S.; AINO, M.; FURIKI, M.; SHIONO, M.; MATOH, T.; BIGGS, A. R. Field application of calcium to reduce Phytophthora stem rot of soybean, and calcium distribution in plants. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 7, p. 812-819, 2010.

TOTH, I. K.; PRITCHARD, L.; BIRCH, P. R. J. Comparative genomics reveals what makes an Enterobacterial plant pathogen. **Annual Review of Phytopathology**, Paulo Alto, v. 44, p. 305-336, 2006.

TOTH, I. K.; BELL, K. S.; HOLEVA, M. C.; BIRCH, P. R. J. Soft-rot *Erwiniae*: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, College Station, v. 4, n. 1, p. 17-30, 2003.

VAN DER PLANK, J. E. Disease resistance in plants. New York: Academic Press, 1968. 206p.

VANJILDORJ, E.; SONG, S. Y.; YANG, Z. H.; CHOI, J. E.; NOH, Y. S.; PARK, S.; LIM, W. J.; CHO, K. M.; YUN, H. D.; LIM, Y. P. Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, n. 10, p. 1581–1591, 2009.

VITALE, S.; ALBERINO, S.; ZOINA, A.; PARISI, B.; CORAZZA, L. Evaluation of resistance to dry and soft rot of potato clones adapted to Mediterranean regions. **Phytopathology Polonica Journal**, Varsóvia, v. 34, p.13–20, 2004.

VRIES IM. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, p. 165-174, 1997.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, London, v. 92, n. 4, p.487–511, 2003.

YANG, Z.; CRAMER, C. L.; LACY, G. H. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectic enzymes: In plant gene activation and roles in soft-rot pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 5, n. 1, p. 104-112, 1992.

Capítulo II

Redução da severidade da podridão mole em couve-chinesa mediada pelo cálcio

1 **REDUÇÃO DA SEVERIDADE DA PODRIDÃO MOLE EM COUVE-**
2 **CHINESA MEDIADA PELO CÁLCIO**

3

4 **K.C.S. Felix¹, C.S.Lima¹, W.J. Oliveira¹, R.L.R. Mariano¹ e ¹E.B. Souza¹**

5 *¹Laboratório de Fitobacteriologia, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,*
6 *Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de*
7 *Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil*

8

9 **RESUMO**

10 A podridão mole da couve-chinesa é uma doença de grande importância
11 econômica para as mesorregiões do Agreste e Mata do estado de Pernambuco-Brasil,
12 com prevalência em 100% das áreas de plantio. O controle químico da doença não tem
13 sido eficiente sendo necessária a busca por novas alternativas de controle. O objetivo
14 deste trabalho foi avaliar o efeito de duas fontes de cálcio em diferentes concentrações,
15 nitrato de cálcio [Ca(NO₃)₂] a 0; 0,15 e 0,3 g L⁻¹ e cloreto de cálcio (CaCl₂) a 0; 1 e 5 g
16 L⁻¹, aplicadas via pulverização foliar e rega do solo no controle da podridão mole,
17 adicionalmente foi analisada a absorção desse elemento pela planta e sua atuação na
18 estrutura foliar e celular através de microscopia de luz e microscopia eletrônica de
19 transmissão. O Ca(NO₃)₂ nas duas formas de aplicação foi eficiente no controle da
20 podridão mole, reduzindo a severidade da doença em até 48,5% via pulverização foliar

¹ Autor para correspondência: E.B. Souza

Fax: +55.81.3320-6205

E-mail: elineidebs@yahoo.com.br

21 (0,15 g L⁻¹). Verificou-se aumento significativo do conteúdo de cálcio foliar apenas nas
22 plantas pulverizadas com as maiores dosagens de Ca(NO₃)₂ e CaCl₂. Em todos os
23 tratamentos com cálcio, a microscopia de luz revelou aumento do número de
24 cloroplastos e melhor estruturação do parênquima paliçádico, enquanto a microscopia
25 eletrônica de transmissão evidenciou aumento de espessura da parede celular, com
26 destaque para o tratamento Ca(NO₃)₂ a 0,15 g L⁻¹ via pulverização foliar e rega do solo.

27

28 **Palavras-chaves:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, nitrato de cálcio,
29 cloreto de cálcio, ultraestrutura e *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*

30

31 **INTRODUÇÃO**

32

33 A podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
34 (Jones) Hauben et al. é considerada a mais destrutiva e importante doença da couve-
35 chinesa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) em muitas áreas produtoras no Brasil e no
36 mundo (Ren *et al.*, 2001; Vanjildorj *et al.*, 2009), com perdas no campo, na pós-
37 colheita, no transporte e na comercialização. Na mesorregião do Agreste do estado de
38 Pernambuco-Brasil, levantamento realizado no ano de 2004 em 22 áreas de plantio de
39 couve-chinesa, constatou 100% de prevalência da doença com incidência variando de 1
40 a 67% (Silva *et al.*, 2007).

41 O controle da podridão mole é difícil uma vez que *P. carotovorum* subsp.
42 *carotovorum* tem ampla gama de hospedeiras, capacidade de sobrevivência em restos
43 de cultura no solo e alta variabilidade. O controle químico tem sido considerado
44 insatisfatório e, ou antieconômico (Vanjildorj *et al.*, 2009). Isso ressalta a necessidade

45 de pesquisas visando novas medidas alternativas de controle para essa doença, a
46 exemplo do uso do cálcio.

47 O cálcio é um macronutriente essencial para a planta com papel importante na
48 integridade estrutural das membranas e da parede celular (Dodd *et al.*, 2010) e, como
49 um mensageiro secundário para inúmeros sinais ambientais (bióticos e abióticos) e
50 hormonais das plantas (Lecourieux *et al.*, 2006). A habilidade do cálcio em reduzir o
51 desenvolvimento de doenças tem sido atribuída, principalmente, à sua interação com a
52 pectina da parede celular, o que diminui a capacidade de patógeno, resultando no
53 decréscimo das enzimas pectinolíticas produzidas pelo patógeno (White e Broadley,
54 2003). Diversos trabalhos têm indicado os efeitos benéficos do cálcio na fisiologia da
55 planta e por consequência na prevenção de doenças, sendo cloreto de cálcio (CaCl_2) e
56 nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] as principais fontes utilizadas (Dayod *et al.*, 2010; Liang *et*
57 *al.*, 2009; McGuire e Kelman, 1986; Singh *et al.*, 1993). Resultados promissores no
58 controle da podridão mole foram obtidos para batata (Bartz *et al.*, 1992; Hajhamed *et*
59 *al.*, 2007; Ngadze, 2012), tomate (Gomes *et al.*, 2005), chicória (Schober e Vermeulen,
60 1999) e couve-chinesa (Park, 1969).

61 Para entender o papel do cálcio na redução da severidade de doenças é
62 importante analisar a absorção desse elemento pela planta e sua atuação na estrutura
63 celular. Na planta, o cálcio move-se com a água, sendo sua translocação e seu teor nos
64 tecidos sujeitos à taxa de transpiração (Collier e Huntington, 1983). Ele pode se
65 acumular principalmente nos tecidos do parênquima paliçádico e esponjoso, havendo
66 também formação de cristais nas células idioblásticas (Storey e Leigh, 2004),
67 concentrações mais elevadas de pectina na parede celular e paredes mais espessas (Conn
68 *et al.*, 2011).

69 No Brasil, estudos sobre o efeito do cálcio no controle da podridão mole em
70 couve chinesa não foram encontrados. No entanto, o CaCl_2 aplicado via pulverização
71 foliar mostrou-se eficiente na redução da severidade podridão mole (37,4%) em plantas
72 de alface (Guerra *et al.*, 2009). Considerando a podridão mole como fator limitante para
73 a produção de couve-chinesa no estado de Pernambuco e a necessidade de medidas
74 eficazes de controle, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de duas fontes de
75 cálcio e duas formas de aplicação no controle da podridão mole, assim como analisar a
76 absorção desse elemento pela planta e sua atuação na estrutura foliar e celular.

77

78 MATERIAL E MÉTODOS

79

80 **Obtenção e identificação do isolado de *Pectobacterium carotovorum* subsp.**
81 ***carotovorum*.** O isolado de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi obtido de planta de
82 couve-chinesa com sintomas de podridão mole, proveniente de área de plantio no
83 município de Camocim de São Félix, Pernambuco, Brasil.

84 A identificação preliminar do isolado foi realizada pelo cultivo da bactéria em
85 meio CPG (caseína hidrolisada 1 g, peptona 10 g, dextrose 10 g, ágar 18 g, água
86 destilada 1000 mL), observando-se após 48 h a presença de colônias com aspecto de
87 “vidro quebrado” (Kelman e Dickey, 1995). Posteriormente, o isolado foi submetido aos
88 testes de coloração de Gram, oxidação/fermentação, oxidase, catalase, podridão mole
89 em frutos de pimentão e tubérculos de batata (Hyman *et al.*, 2002), e patogenicidade em
90 couve-chinesa (híbrido Natsume) (Ren *et al.*, 2001). A identificação ao nível de
91 subespécie foi baseada na utilização de α -metil glucosídios; produção de ácido a partir
92 de sorbitol, lactose e melibiose; sensibilidade à eritromicina; e crescimento a 37°C

93 (Hyman *et al.*, 2002). A identificação molecular do isolado ao nível de espécie foi
94 também realizada com os *primers* específicos Y1
95 (5'TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT3') e Y2
96 (5'CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT3') (Darrasse *et al.* 1994). Em seguida o
97 isolado foi preservado em água destilada esterilizada (Mariano e Silveira, 2005).

98 Para utilização nos experimentos, o isolado foi cultivado em meio CPG por 48 h
99 a temperatura de 28°C. Após este período, água destilada esterilizada foi adicionada à
100 placa de Petri contendo o crescimento bacteriano e a concentração da suspensão foi
101 ajustada em fotolorímetro (Analyser[®], 500M, Analyser, Brasil) a 570 nm, onde $A_{570} =$
102 0,36 equivale a $1,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹.

103

104 **Redução da severidade da podridão mole em couve-chinesa mediada pelo**
105 **cálcio.** Nos experimentos foram utilizadas sementes de couve-chinesa híbrido Natsume,
106 muito cultivado nas áreas produtoras da mesorregião do Agreste de Pernambuco. A
107 semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno expandido com 200 células,
108 contendo uma mistura de substrato (Basaplant[®]) e solo 1:1 (v/v). Após 20 dias as mudas
109 foram transplantadas para vasos com capacidade de 2500 mL contendo substrato,
110 húmus e solo 1:1:2 (v/v/v). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, sendo
111 irrigadas diariamente.

112 Para o controle da podridão mole mediado pelo cálcio foram testados $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e
113 CaCl_2 , aplicados via pulverização foliar (pulverização das folhas até o escorrimento,
114 com o auxílio de um atomizador manual) e rega do solo, pela e deposição de 100 mL da
115 solução ao redor do colo da planta.

116 As dosagens de cálcio utilizadas foram $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 0; 0,15 e 0,3 g L^{-1} e CaCl_2 a
117 0; 1 e 5 g L^{-1} , com base nos estudos de Guerra *et al.* (2009) . Os produtos foram diluídos
118 em água destilada e aplicados quatro dias após o transplântio das mudas de couve-
119 chinesa, em intervalo de quatro dias, totalizando cinco aplicações. As plantas foram
120 inoculadas com o patógeno quatro dias após as últimas aplicações.

121 Plantas com 44 dias de idade foram inoculadas na base do pecíolo da segunda e
122 terceira folhas definitivas pelo método de picada. Este método consiste no ferimento do
123 tecido vegetal com alfinete entomológico a uma profundidade de 1 mm, seguindo-se da
124 deposição de 20 μL de suspensão bacteriana, com auxílio de um micropipetador (Mello
125 *et al.*, 2011). Após a inoculação, as plantas foram submetidas à câmara úmida, durante 6
126 h em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado
127 com seis repetições, sendo cada uma constituída por uma planta. Os experimentos
128 foram conduzidos duas vezes para cada fonte de cálcio, forma de aplicação e suas
129 respectivas concentrações, sendo denominados de experimentos 1 e 2. A média de
130 temperatura e umidade relativa do ar foram de 26 e 28°C e 76 e 85%, para os
131 experimentos 1 e 2, respectivamente.

132 As avaliações foram realizadas a intervalos de 6 horas até 48 h, observando-se a
133 severidade da doença, estimada com o auxílio de escala descritiva de 1 a 9 (Ren *et al.*,
134 2001), onde: 1 = sem lesão no ponto de inoculação, 2 = lesões menores que 5 mm, 3 =
135 lesões entre 5 e 10 mm, 4 = lesões maiores que 10 mm, porém não atingindo as folhas, 5
136 = lesão alcançando o limbo foliar e o caule, 6 = caule infectado, porém sem atingir as
137 folhas não inoculadas, 7 = caule e folhas não inoculadas infectadas, 8 = planta inteira
138 próxima à morte e 9 = planta morta.

139

140 **Análise do tecido vegetal de couve-chinesa para conteúdo de cálcio.** As
141 partes aéreas das plantas com 46 dias de idade, oriundas dos experimentos anteriores,
142 foram coletadas e secas em estufa de secagem (Luferco 41140, Lutz Ferrando, Brasil)
143 por 72 h a 65°C e moídas em moinho tipo Willey. O conteúdo de cálcio foi determinado
144 por espectrofotometria de absorção atômica, conforme metodologia da Empresa
145 Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 2006). Foram avaliadas três repetições
146 para cada tratamento, sendo estas constituídas de uma amostra composta de duas
147 repetições dos experimentos anteriores. Para cada repetição foram analisadas 0,5 g do
148 material vegetal.

149

150 **Análise de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão em**
151 **tecido foliar de couve-chinesa.** As plantas de couve-chinesa foram tratadas com
152 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0; 0,15 e 0,3 g L⁻¹) e CaCl_2 (0, 1, e 5 g L⁻¹) via pulverização foliar ou rega do
153 solo, como descrito anteriormente, sendo coletadas aos 44 dias de idade e analisadas
154 utilizando a metodologia de Rabelo *et al.* (2011), com modificações. Fragmentos de
155 folhas foram fixados por 2 h em uma solução de glutaraldeído a 2,5%, formaldeído a
156 4,0% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M em pH 7,2, mantidos à temperatura ambiente.
157 As amostras foram fixadas três vezes com o mesmo tampão por 10 min, pós-fixadas
158 com 1% tetróxido de ósmio, 10 mM de cloreto de cálcio e 1,6% de ferricianeto de
159 potássio em 0,2 M de tampão cacodilato de sódio, durante 1 h. Em seguida, as amostras
160 foram lavadas duas vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por 10 min e uma vez
161 em água destilada por 10 min, tratadas com uranila 5% por 1 h e, após esse período, as
162 mesmas foram lavadas três vezes com água destilada por 10 min. Subsequentemente, as
163 amostras foram desidratadas em uma série crescente de soluções de acetona (30%, 50%,

164 70%, 90% e três vezes de 100%) por 10 min cada. Depois, as amostras foram infiltradas
165 com resina Epoxi e acetona na proporção 1:2, 1:1, 2:1 (v/v) e resina Epoxi pura,
166 respectivamente, sendo mantidas durante 12 h em todas as etapas de infiltração. Após a
167 infiltração, as amostras foram emblocadas e polimerizadas com resina Epoxi pura por 3
168 dias a 60°C em estufa. Secções semifinas (350 nm) e ultrafinas (70 nm) foram
169 realizadas utilizando um micrótomo-Reichert Jung e as amostras foram coletadas em
170 grades de cobre (300 mesh), coradas com acetato uranila a 5% por 25 min e com citrato
171 de chumbo por 3 min. As estruturas anatômicas das secções semifinas foram
172 examinadas e fotografadas com auxílio do microscópio óptico (TNB-04D, Option,
173 Brasil). As secções ultrafinas foram observadas a 80 kV com um microscópio eletrônico
174 de transmissão (MET) (Morgagni 268D, FEI™, Japão), sendo realizadas análises
175 qualitativas da estrutura foliar e celular em imagens digitais.

176

177 **Análises estatísticas.** Os dados de severidade da podridão mole e conteúdo de
178 cálcio no tecido foliar foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação
179 de médias pelo teste de LSD (Least Significant Difference) ao nível de 5% de
180 probabilidade, e correlação de Pearson, ao nível de 5% de probabilidade, usando o
181 software STATISTIX® (versão 9,0, Analytical Software, Tallahassee, USA).

182

183 **RESULTADOS**

184

185 **Obtenção e identificação do isolado de *Pectobacterium carotovorum* subsp.**
186 ***carotovorum*.** O isolado de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* obtido foi denominado
187 de Pcc-C. Apresentou colônias típicas com aspecto de “vidro quebrado” quando

188 crescido em meio CPG e foi identificado como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* por
189 apresentar as seguintes características: Gram-negativa, oxidase negativa, catalase
190 positiva, resistência a eritromicina, comportamento anaeróbico facultativo, capacidade
191 de crescer a 37°C e incapacidade de utilizar α -metil glucosídios, patogenicidade em
192 plantas de couve-chinesa, frutos de pimentão verde e tubérculo de batata. A
193 identificação molecular, via PCR com primers específicos, foi confirmada ao nível de
194 espécie pela detecção de bandas de 434 pb. Esse isolado foi depositado na Coleção de
195 Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de
196 Pernambuco.

197

198 **Redução da severidade da podridão mole em couve-chinesa mediada pelo**
199 **cálcio e análise do tecido vegetal e conteúdo de cálcio.** Os resultados dos dois
200 experimentos para efeito de cada combinação fonte de cálcio e forma de aplicação na
201 redução da severidade da podridão mole diferiram significativamente entre si ($P < 0,05$) e
202 foram analisados separadamente.

203 A aplicação de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ via pulverização foliar reduziu significativamente
204 ($P < 0,05$) a severidade da podridão mole em couve-chinesa em até 48,5% na dosagem
205 $0,15 \text{ g L}^{-1}$, apenas no experimento 1 (Fig. 1A). Via rega do solo foi eficiente no controle
206 da doença nos dois experimentos, reduzindo a severidade da doença em até 26,9% na
207 dosagem $0,15 \text{ g L}^{-1}$ no experimento 2 (Fig. 1B). CaCl_2 no experimento 1 não foi capaz
208 de reduzir a severidade da podridão mole. Já no experimento 2 a severidade da doença
209 foi reduzida significativamente ($P < 0,05$) pelo CaCl_2 apenas na dosagem 1 g L^{-1} , quando
210 aplicado via pulverização foliar (Fig. 1C e 1D). Maior severidade da doença foi

211 observada no experimento 2, para ambas as fontes de cálcio e formas de aplicação (Fig.
212 1).

213 Quanto ao conteúdo foliar de cálcio, os resultados dos dois experimentos não
214 diferiram significativamente entre si ($P < 0,05$), sendo os dados analisados
215 conjuntamente. Nas plantas de couve-chinesa pulverizadas com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 , nas
216 maiores dosagens ($0,30$ e $5,0 \text{ g L}^{-1}$), o conteúdo foliar de cálcio foi significativamente
217 ($P < 0,05$) elevado, variando de $29,8$ a $67,3\%$, respectivamente (Fig. 2). Acúmulo de
218 cálcio não foi observado quando aplicado os produtos via rega do solo. Não foi
219 verificada correlação significativa ($P < 0,05$) entre o teor de cálcio nas folhas e a redução
220 da severidade da podridão mole, bem como influência da temperatura e umidade
221 relativa do ar na absorção do íon.

222

223 **Análise de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão em**
224 **tecido foliar de couve-chinesa.** As análises de microscopia de luz em tecido foliar de
225 couve-chinesa mostraram que não houve formação e acúmulo visível de cristais de
226 cálcio (cristais de oxalato de cálcio) em nenhum dos tratamentos com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2
227 (Fig. 3 e 4). Nas plantas tratadas com $0,15 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ em ambas formas de
228 aplicação, o tecido do parênquima paliádico mostrou-se mais estruturado, a forma das
229 células mais regular, com poucos espaços intercelulares (Fig. 3C, 3D, 3E e 3F).
230 Verificou-se uma maior presença de cloroplastos com o aumento na concentração de
231 CaCl_2 em ambas as formas de aplicação (Fig. 4), o que foi observado em menor
232 intensidade para os tratamentos com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Fig. 3).

233 Nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar, nas
234 folhas de plantas tratadas com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, um maior espessamento da parede celular e

235 lamela média em relação ao controle (Fig. 5) com o aumento mais evidente na dosagem
236 de $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2$ (Fig. 5C e 5D). Também foi verificado um aumento gradativo
237 no espessamento da parede celular com o aumento nas dosagens de CaCl_2 (Fig. 6),
238 porém em menor intensidade do que com $\text{Ca(NO}_3)_2$. O tratamento controle apresentou
239 parede celular com espessura mais reduzida, lamela média pouco evidente e uma
240 dissociação das paredes celulares (Fig. 6A), além da desestruturação da parede celular e
241 desorganização da membrana plasmática (Fig. 6B).

242

243 **DISCUSSÃO**

244

245 O isolado Pcc-C de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* obtido de planta de
246 couve-chinesa com sintomas de podridão mole apresentou todas as características
247 bioquímicas, fisiológicas e moleculares da espécie e subespécie (Alvarado *et al.*, 2011;
248 Hyman *et al.*, 2002; Kelman e Dickey, 1995; Kang *et al.*, 2000; Pérombelon e Kelman,
249 1980).

250 O cálcio é um macronutriente inorgânico que tem sido citado como eficiente na
251 redução de algumas doenças de plantas, devido ao seu predominante e importante papel
252 estrutural e funcional na parede celular (Biggs, 2004; Sugimoto *et al.*, 2010; Yamazaki
253 e Hoshina, 1995). A redução da severidade de 48,5% no controle da podridão mole em
254 couve-chinesa, após aplicação de $\text{Ca(NO}_3)_2$ via pulverização foliar ou rega do solo,
255 confirmam estudos similares em batata realizados por Conway *et al.* (1992). CaCl_2 não
256 foi eficiente no controle da doença. Embora este resultado discorde de outros trabalhos,
257 os quais foram eficientes no controle da podridão-mole em batata (Hajhamed *et al.*,

258 2007), chicória (Schober e Vermeulen, 1999), tomate (Gomes *et al.*, 2005) e couve-
259 chinesa (Park, 1969), utilizando CaCl_2 .

260 Apesar do bom nível de controle obtido com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ no experimento 1, a
261 eficiência não foi mantida no experimento 2 (Fig. 1), onde ocorreu uma maior
262 severidade da doença. Este resultado pode estar relacionado à temperatura e à umidade
263 relativa do ar, que foram mais elevadas (28°C e 85%) em relação ao experimento 1
264 (26°C e 76%). Segundo Pérombelon (1992), estas condições ambientais têm grande
265 influência na severidade da podridão mole. A temperatura de 28°C proporcionou maior
266 maceração em tubérculos de lírios por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, observando-
267 se maior atividade da enzima pectato liase, o que indica a importância dessa variável
268 ambiental no progresso da doença (Ni *et al.*, 2010). Além das condições de temperatura
269 e umidade mais baixas, a eficiência do controle com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ observada no
270 experimento 1 (Fig. 1) pode estar associada à ação do cálcio, retardando a atividade das
271 enzimas pectinolíticas. Em chicória, a responsabilidade parcial da resistência à podridão
272 mole foi atribuída ao retardamento pelo cálcio da atividade das enzimas pectato liase e
273 poligalacturonase, sendo estes fatores primários de patogenicidade de *P. carotovorum*
274 subsp. *carotovorum*, detectadas apenas 24 e 48 h após a inoculação do patógeno,
275 respectivamente (Schober e Vermeulen, 1999). Essa ação do cálcio também foi sugerida
276 na redução da podridão mole e canela preta em tubérculos de batata (Ngadze, 2012).

277 O conteúdo de cálcio nas folhas de couve-chinesa, oriundas de plantas tratadas
278 com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 via pulverização foliar, foi elevado nas maiores dosagens testadas
279 embora não tenha havido correlação com a redução da severidade da podridão mole. No
280 entanto, em batata, a redução da doença pelo $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi associada ao aumento da
281 concentração de cálcio nos tubérculos (Conway *et al.*, 1992). De acordo com esses

282 autores, essa relação pode variar de acordo com o tipo de cultivar, solo e fonte de cálcio
283 utilizada. Por análise de espectrofotometria foi observada uma relação diretamente
284 proporcional do conteúdo de cálcio em plantas de *Brassica rapa* quando suplementadas
285 com CaCl_2 , com uma maior concentração ($25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Ca}$) nas plantas tratadas com 3,5
286 g do produto, tendo o mesofilo, principalmente o parênquima paliçádico, o maior
287 acúmulo desse íon (Rios *et al.*, 2012).

288 A ocorrência de temperatura e umidade relativa do ar mais elevadas no
289 experimento 2 poderia ter favorecido a absorção foliar de cálcio e consequente maior
290 controle da doença, porém, isso não foi verificado. Essas condições ambientais
291 favorecem a transpiração foliar, que pode proporcionar a translocação do cálcio via
292 transpiração e aumentar a quantidade de cálcio na folha (Conway *et al.*, 1992). O fluxo
293 de água carrega íons de cálcio via xilema, das raízes para as folhas, sendo também
294 distribuído apoplásticamente através da parede celular (White e Broadley, 2003). No
295 entanto neste estudo não foi observado acúmulo significativo de cálcio nas folhas
296 quando $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 foram aplicados via rega do solo. Por outro lado, como já
297 citado, a temperatura e a umidade relativa do ar mais elevadas também favorecem o
298 patógeno (Pérombelon, 1992), inclusive pela maior atividade da pectatoliase (Ni *et al.*,
299 2010).

300 Diferentemente do que ocorreu com a quantificação foliar de cálcio, as
301 microscopias de luz e eletrônica evidenciaram as modificações promovidas pelo cálcio
302 na estrutura foliar e celular, sendo possível sua correlação com a redução da podridão
303 mole.

304 A ultraestrutura do mesofilo foliar de couve-chinesa apresenta muitos espaços
305 intercelulares no tecido do parênquima paliçádico, o que pode favorecer a colonização

306 pelo patógeno. O apoplasto, ou espaço intercelular, é um ambiente dinâmico, onde
307 ocorrem muitos processos metabólicos e de transporte (Sattelmacher, 2001). Apesar de
308 ser um ambiente nutricionalmente limitado, algumas bactérias possuem especialização
309 nutricional e fisiológica para colonizar esse espaço, a exemplo de bactérias necrotróficas
310 como *P. carotovorum*, que aumentam sua densidade populacional e passam a colonizar
311 e modular o metabolismo nesse ambiente (Rico *et al.*, 2009). A melhor estruturação do
312 tecido do parênquima paliçádico observada nas plantas tratadas com 0,15 g L⁻¹ de
313 Ca(NO₃)₂ (Fig. 3C, 3D, 3E e 3F), com melhor organização celular e poucos espaços
314 intercelulares, pode ter reduzido a colonização bacteriana e aumentado a resistência da
315 planta, reduzindo a severidade da doença (Fig. 1A e 1B).

316 A maior presença de cloroplastos observada nos tratamentos com cálcio, mais
317 evidente naqueles com CaCl₂, pode estar relacionada com a capacidade dessa organela
318 de armazenar uma grande quantidade desse íon. O cálcio apresenta papel importante na
319 ativação de enzimas plastidiais, existindo uma relação cálcio-dependente com os
320 cloroplastos nos processos ligados, principalmente, à maquinaria fotossintética e à
321 fixação de CO₂ (Rocha e Vothknecht, 2012). O aumento do número de cloroplastos
322 favoreceu a fisiologia da planta, mas, possivelmente, não interferiu na colonização do
323 patógeno e redução da severidade da doença, uma vez que a maioria dos tratamentos
324 com CaCl₂ não foi eficiente no controle da podridão mole.

325 A parede celular é o principal componente estrutural do apoplasto na interação
326 planta-patógeno, constituindo a primeira barreira física de acesso ao nutriente celular
327 para as bactérias (Rico *et al.*, 2009). A microscopia eletrônica de transmissão
328 evidenciou um nítido aumento na espessura da parede celular das folhas de couve-
329 chinesa para todos os tratamentos com cálcio, destacando-se o tratamento com

330 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ em ambas as dosagens e formas de aplicação (Fig. 5 e 6), o que
331 possivelmente foi responsável pela redução da severidade da podridão mole por essa
332 fonte de cálcio (Fig. 1A e 1B). O incremento de cálcio na planta pode ser
333 correlacionado com a resistência natural da planta a *P. carotovorum* subsp.
334 *carotororum*, devido a manutenção da estruturação e integridade da parede celular
335 (Czajkowski *et al.*, 2011).

336 A importância do cálcio ficou bem evidenciada no tratamento controle, o qual
337 apresentou uma parede celular menos estruturada. O decréscimo na suplementação de
338 cálcio causa dissociação das paredes celulares das plantas, com dano na membrana
339 nuclear, membrana plasmática e membrana dos cloroplastos (Liu *et al.*, 2012). O maior
340 espessamento da parede celular e lamela média observado no tratamento com CaCl_2 a 5
341 g L^{-1} via pulverização foliar (Fig. 6C e 6D) e o aumento do conteúdo foliar de cálcio nos
342 tecidos das folhas de couve-chinesa (Fig. 2C e 2D) não foram suficientes para impedir a
343 colonização da bactéria e obter o controle da doença (Fig. 1C e 1D).

344 Assim sendo, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 0,15 e 0,3 g L^{-1} , aplicado via pulverização foliar e rega
345 do solo, apresenta potencial para o controle da podridão mole em plantas de couve-
346 chinesa, estando essa eficiência associada a melhor estruturação e integridade da parede
347 celular.

348

349 **AGRADECIMENTOS**

350

351 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
352 pela concessão da bolsa de estudo a Kátia C. S. Felix, e de pesquisa a Rosa L. R.

353 Mariano e Elineide B. Souza e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado
354 de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro (APQ 0583-5.01/08).

355 **REFERÊNCIAS**

356

357 Alvarado I.C.M., Michereff S.J., Mariano R.L.R., Souza E.B., Quezado-Duval A.M.,
358 Resende L.V., Cardoso E., Mizubuti E.S.G., 2011. Characterization and variability of
359 soft rot-causing bacteria in chinese cabbage in north eastern Brazil. *Journal of Plant*
360 *Pathology* **93**: 173-181.

361 Bartz J.A., Locascio S.J., Weingartner D.P., 1992. Calcium and potassium fertilization
362 of potatoes grown in North Florida: II Effect on the bacterial soft rot potential in the
363 tubers. *American Potato Journal* **69**: 39-50.

364 Biggs A.R., 2004. Effect of inoculum concentration and calcium salts on infection of
365 apple fruit by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* **88**: 147-151.

366 Collier G.F., Huntington V.C., 1983. The relationship between leaf growth, calcium
367 accumulation and distribution, and tipburn development in field-grown butterhead
368 lettuce. *Scientia Horticulturae* **21**: 123-128.

369 Conn S.J., Gilliham M., Athman S., 2011. Cell-specific vacuolar calcium storage
370 mediated by *CAX1* regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and
371 plant productivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**: 240-257.

372 Conway W.S., Sams C.E., McGuire R.G., Kelman A., 1992. Calcium treatment of
373 apples and potatoes to reduce post-harvest decay. *Plant Disease* **76**: 329-334.

374 Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., van Veen J.A., van der Wolf J.M., 2011. Control
375 of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya*
376 species: a review. *Plant Pathology* **60**: 999-1013.

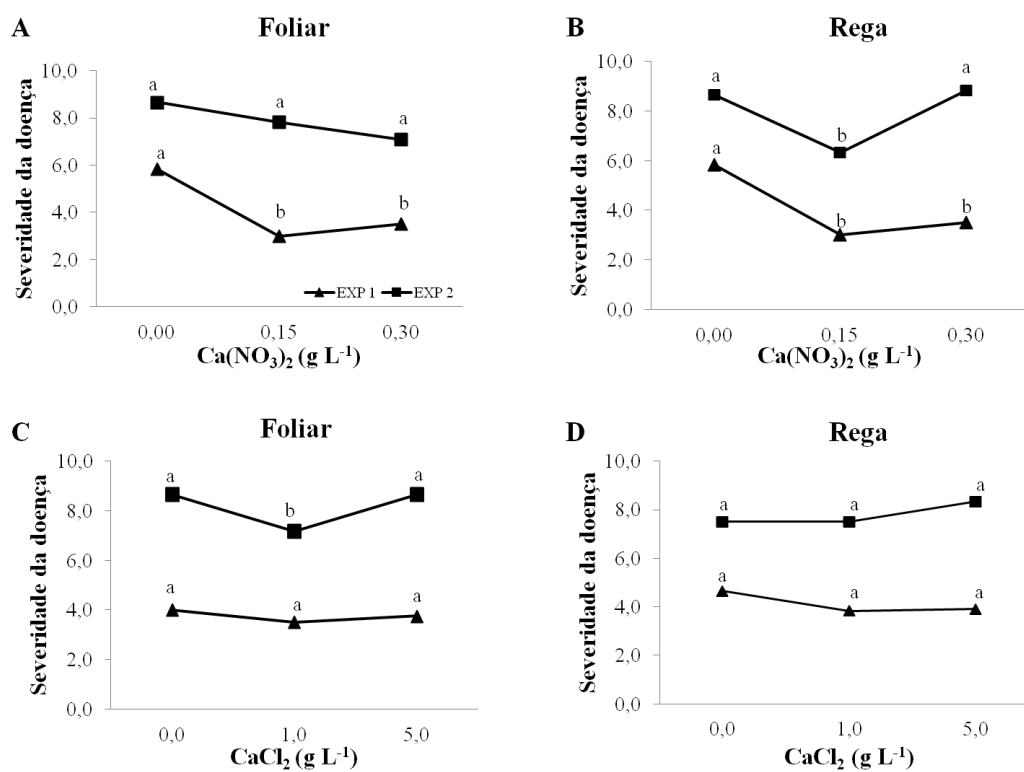
- 377 Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y., 1994. PCR and restriction fragment
378 length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in
379 relation to potato disease. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 1437-1443.
- 380 Dayod M., Tyerman S.D., Leigh R.A., Gilliam M., 2010. Calcium storage in plants
381 and the implications for calcium biofortification. *Protoplasma* **247**: 215–231.
- 382 Dodd A.N, Kudla J, Sanders D., 2010. The language of calcium signaling. Annual
383 Review *Plant Biology* **61**: 593–620.
- 384 Embrapa 2006. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa,
385 Brasília, Brasil.
- 386 Gomes A.M.A., Silveira E.B., Mariano R.L.R., 2005. Tratamento pós-colheita com
387 cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. *Horticultura*
388 *Brasileira*, Brasília, **23**: 108-111.
- 389 Guerra M.L., Oliveira J.C., Naue C.R., Silva C.L., Mariano R.L.R., 2009. Podridão-
390 mole da alface: controle com cálcio e levedura. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e
391 Extensão da UFRPE, 2009, Recife. Anais da Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão
392 da UFRPE. Recife: UFRPE.
- 393 Hajhamed A.A., El-Sayed W.M.A., El-Yazied A.A., El-Ghaffar N.Y.A., 2007.
394 Suppression of bacterial soft rot disease of potato. *Egyptian Journal Phytopathology*
395 **35**: 69-80.
- 396 Hyman L.J., Toth I.K., Pérombelon M.C.M., 2002. Isolation and identification, In:
397 Pérombelon M.C.M., Van Der Wolf J.M. (eds). Methods for the Detection and
398 Quantification of *Erwinia carotovora* subsp, *atroseptica* (*Pectobacterium*
399 *carotovorum* subsp, *atrosepticum*) on Potatoes: a Laboratory Manual, 2nd Ed, pp.
400 66-77. Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, UK.

- 401 Kang H.W., Kwon S.W., Go S.J., 2003. PCR-based specific and sensitive detection of
402 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-
403 PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology* **52**: 127-133.
- 404 Kelman A., Dickey R.S., 1995. Detection of *Erwinia carotovora* and *E. chrysanthemi*.
405 In: Saettler A.W., Schaad N.W., Roth, D.A. (eds). *Detection of Bacteria on Seed and*
406 *Other Planting Material*, pp. 76-91. APS Press, Saint Paul, USA.
- 407 Lecourieux D., Ranjeva R., Pugin A., 2006. Calcium in plant defence-signalling
408 pathways. *New Phytologist*. **171**: 249-269.
- 409 Liang W., Wang M., Ai X., 2009. The role of calcium in regulating photosynthesis and
410 related physiological indexes of cucumber seedlings under low light intensity and
411 suboptimal temperature stress. *Scientia Horticulturae* **123**: 34–38.
- 412 Liu H., Liu W., Song S., Sun G., Chen R., 2012. Effect of calcium nutrient on calcium
413 distribution and ultrastructure of cell and chloroplast in bunching onion leaf. *Applied*
414 *Mechanics and Materials* **142**: 111-115.
- 415 McGuire R.G, Kelman A., 1986. Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue
416 maceration by *Erwinia carotovora* pv *atroseptica*. *Phytopathology* **76**: 401–406.
- 417 Mello M.R.F., Silveira E.B., Viana I.O., Guerra M.L., Mariano R.L.R., 2011. Uso de
418 antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa.
419 *Horticultura Brasileira* **29**: 78-83.
- 420 Ngadze, E., 2012. Identification and control of potato soft rot and blackleg pathogens in
421 Zimbabwe. PhD. Tese. University of Pretoria, Pretoria, South Africa.
- 422 Ni L., Guo L., Custers J.B.M., Zhang L., 2010. Characterization of calla lily soft rot
423 caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ZT0505: Bacterial

- 424 growth and pectate lyase activity under different conditions. *Journal of Plant*
425 *Pathology* **92**: 421-428.
- 426 Pagel W., Heitefuss R., 1990. Enzyme activities in soft rot pathogenesis of potato
427 tubers: Effect of calcium, pH and degree of pectin esterification on the activities of
428 polygalacturonase and pectate lyase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*
429 **37**: 9–25.
- 430 Park S.K., 1969. Studies in the relationship between Ca nutrient and soft rot disease in
431 Chinese cabbage. *Research Report to Rural Development Administration* **12**: 63-70.
- 432 Pérombelon M.C.M., Kelman A., 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review*
433 *of Phytopathology* **18**: 361-387.
- 434 Pérombelon M.C.M., 1992. Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction
435 and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **98**: 135-146.
- 436 Rabelo G.R., Marques J.B.C., Zottich U., Dias G.B., Miguel E.C., Gomes V.M., Cunha
437 M. D., 2011. Leaf structure, microanalysis and characterization of the látex protein
438 profile of *Pachystroma longifolium* (Nees) I.M. Jonhst. (Euphorbiaceae) in a
439 seasonally dry Atlantic Forest. *Acta Botanica Brasilica* **25**: 150-159.
- 440 Ren J., Petzoldt R., Dickson M.H. 2001, Genetics and population improvement
441 resistance to bacterial soft rot Chinese cabbage. *Euphytica* **117**: 197-207.
- 442 Rico A., Jones R., Preston G.M., 2009. Adaptation to the plant apoplast by plant
443 pathogenic bacteria. In: Jackson R.W. (ed.) *Plant pathogenic bacteria: Genomics and*
444 *molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, USA.
- 445 Rios J.J., Lochlainn S.Ó., Devonshire J., Graham N.S., Hammond J.P., King G.J.,
446 White, P.J., Kurup, S., Broadley, M.R., 2012. Distribution of calcium (Ca) and

- 447 magnesium (Mg) in the leaves of *Brassica rapa* under varying exogenous Ca and Mg
448 supply. *Annals of Botany* **109**: 1081-1089.
- 449 Rocha A.G., Vothknecht U.C., 2012. The role of calcium in chloroplast - an intriguing
450 and unresolved puzzle. *Protoplasma* **249**: 957-966.
- 451 Sattelmacher B., 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition.
452 *New Phytologist* **149**: 167–192.
- 453 Schober B.M., Vermeulen T., 1999. Enzymatic maceration of witloof chicory by the
454 soft rot bacteria *Erwinia carotovocra* subsp. *carotovora*: the effect of nitrogen and
455 calcium treatments of the plant on pectic enzyme production and disease
456 development. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 341–349.
- 457 Silva A.M.F., Mariano R.L.R., Michereff S.J., Silveira E.B., Medeiros F.H.V., 2007.
458 Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface e couve-chinesa em
459 Pernambuco. *Caatinga* **20**: 84-93.
- 460 Singh B.P., Tandon D.K., Kalra S.K., 1993. Changes in postharvest quality of mangoes
461 affected by preharvest application of calcium salts. *Scientia Horticulturae* **54**: 211–
462 219.
- 463 Sugimoto T., Watanabe K., Yoshida S., Aino M., Furiki M., Shiono M., Matoh T.,
464 Biggs A.R., 2010. Field application of calcium to reduce *Phytophthora* stem rot of
465 soybean, and calcium distribution in plants. *Plant Disease* **94**: 812-819.
- 466 Storey R., Leigh R.A., 2004. Processes modulating calcium distribution in citrus leaves.
467 An investigation using X-ray microanalysis with strontium as a tracer. *Plant*
468 *Physiology* **136**: 3838–3848.
- 469 Vanjildorj E., Song S.Y., Yang Z.H., Choi J.E., Noh Y.S., Park S., Lim W.J., Cho K.M.,
470 Yun H.D., Lim Y.P., 2009. Enhancement of tolerance to soft rot disease in the

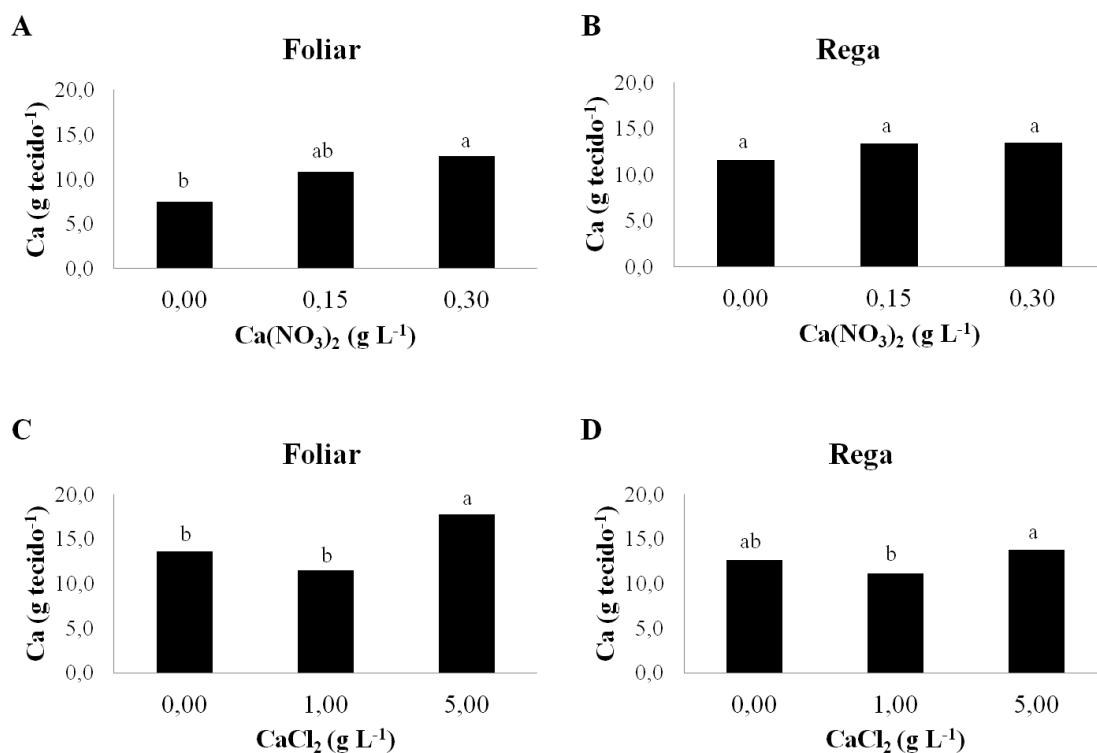
- 471 transgenic chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin.
472 *Plant Cell Reports* **28**: 1581–1591.
- 473 White P.J., Broadley M.R., 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**: 487–511.
- 474 Yamazaki H., Hoshina T., 1995. Calcium nutrition affects resistance of tomato
475 seedlings to bacterial wilt. *HortScience* **30**: 91-93.
- 476



477

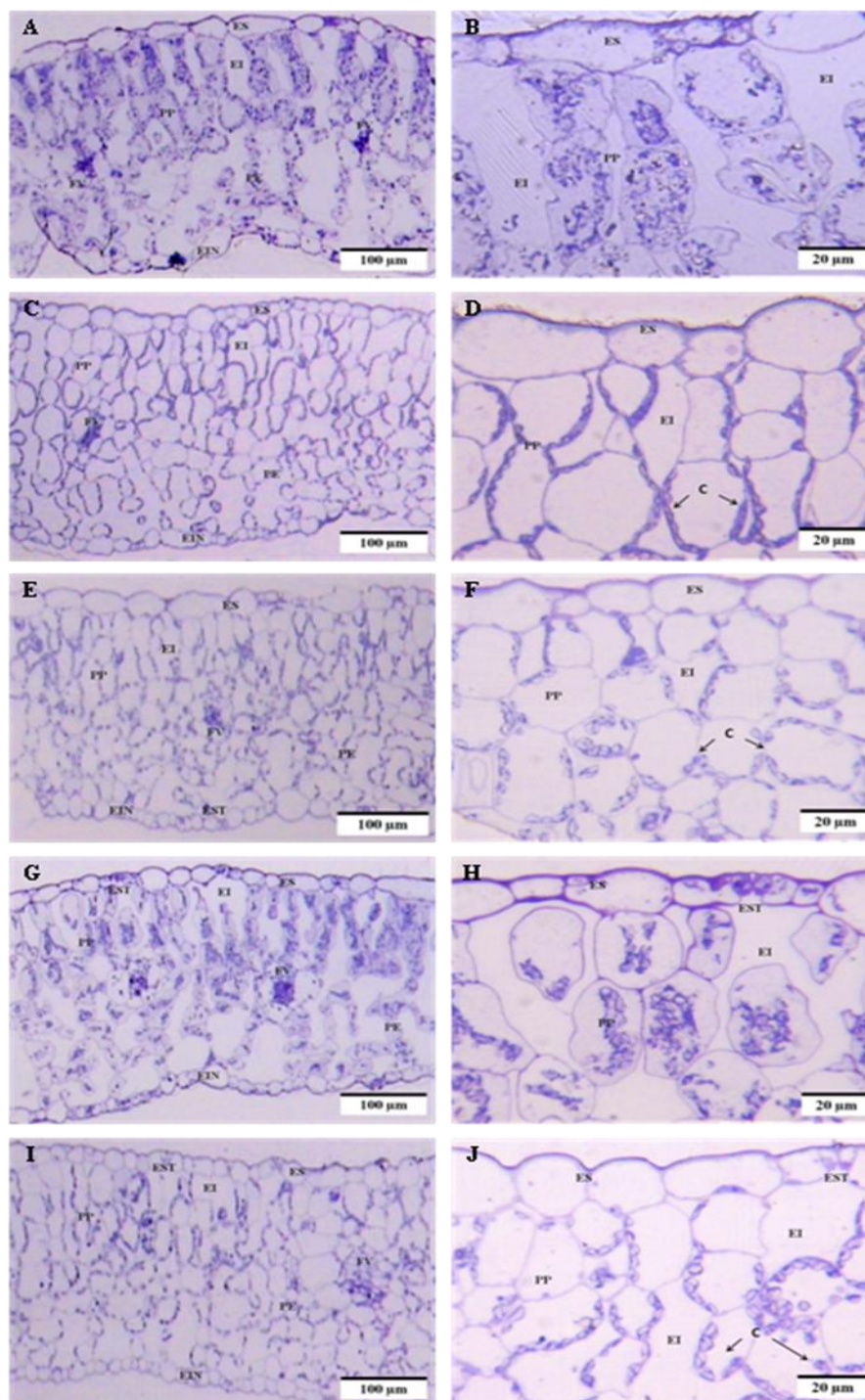
478 **Figura 1.** Influência do nitrato de cálcio Ca(NO₃)₂ e cloreto de cálcio (CaCl₂), aplicados
 479 via pulverização foliar (A e C) e rega do solo (B e D), respectivamente, no controle da
 480 podridão mole em couve-chinesa (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) em dois
 481 experimentos (Exp. 1 ▲ e Exp. 2 ■). (Médias seguidas da mesma letra em cada
 482 experimento não diferem significativamente entre si pelo Teste LSD ao nível de 5% de
 483 probabilidade).

484



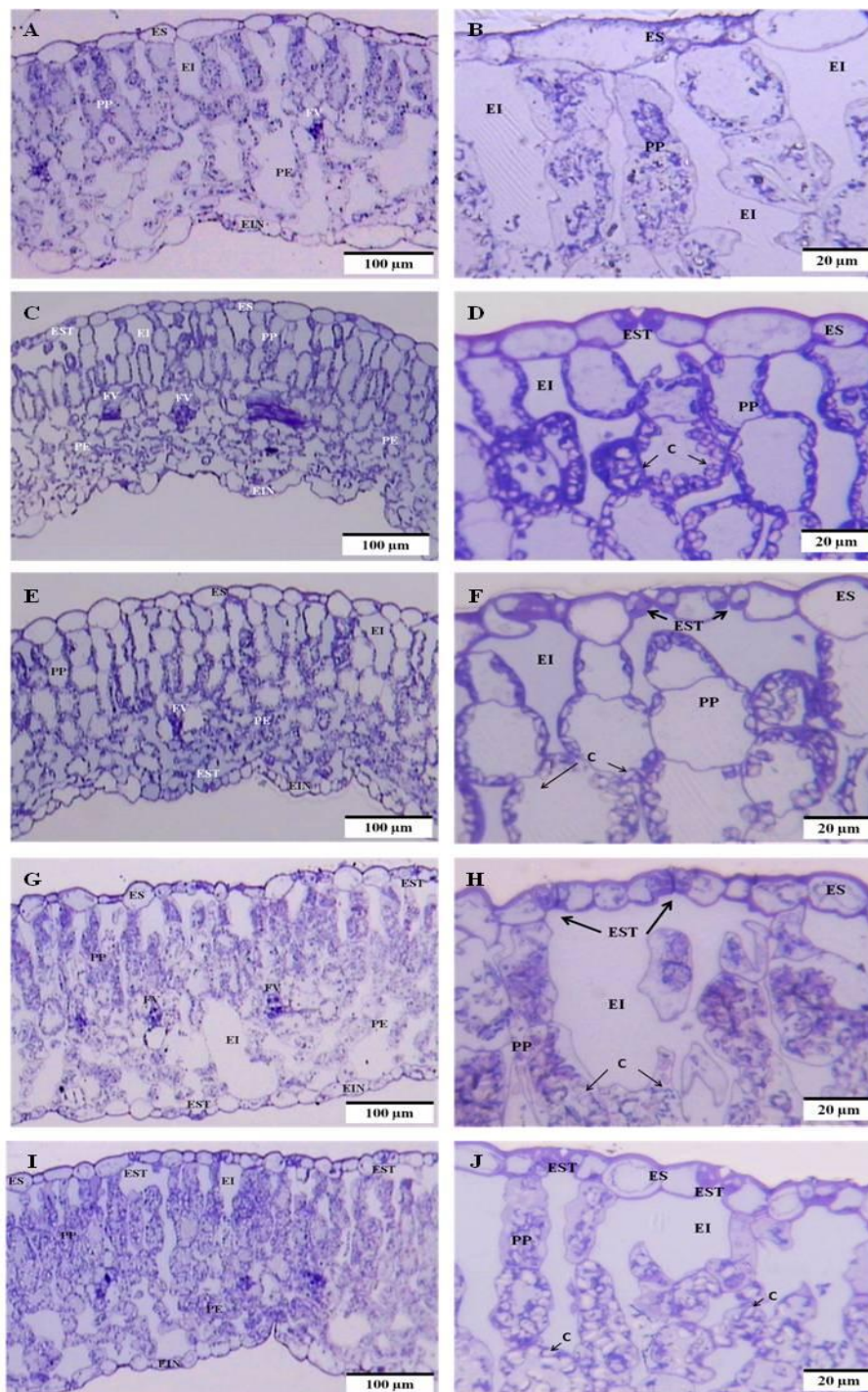
485

486 **Figura 2.** Análise do teor de cálcio no tecido foliar de couve-chinesa (*Brassica rapa*
487 subsp. *pekinensis*) tratada com nitrato de cálcio Ca(NO₃)₂ e cloreto de cálcio (CaCl₂),
488 aplicados via pulverização foliar (A e C) e rega do solo (B e D), respectivamente.
489 (Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste
490 LSD ao nível de 5% de probabilidade).



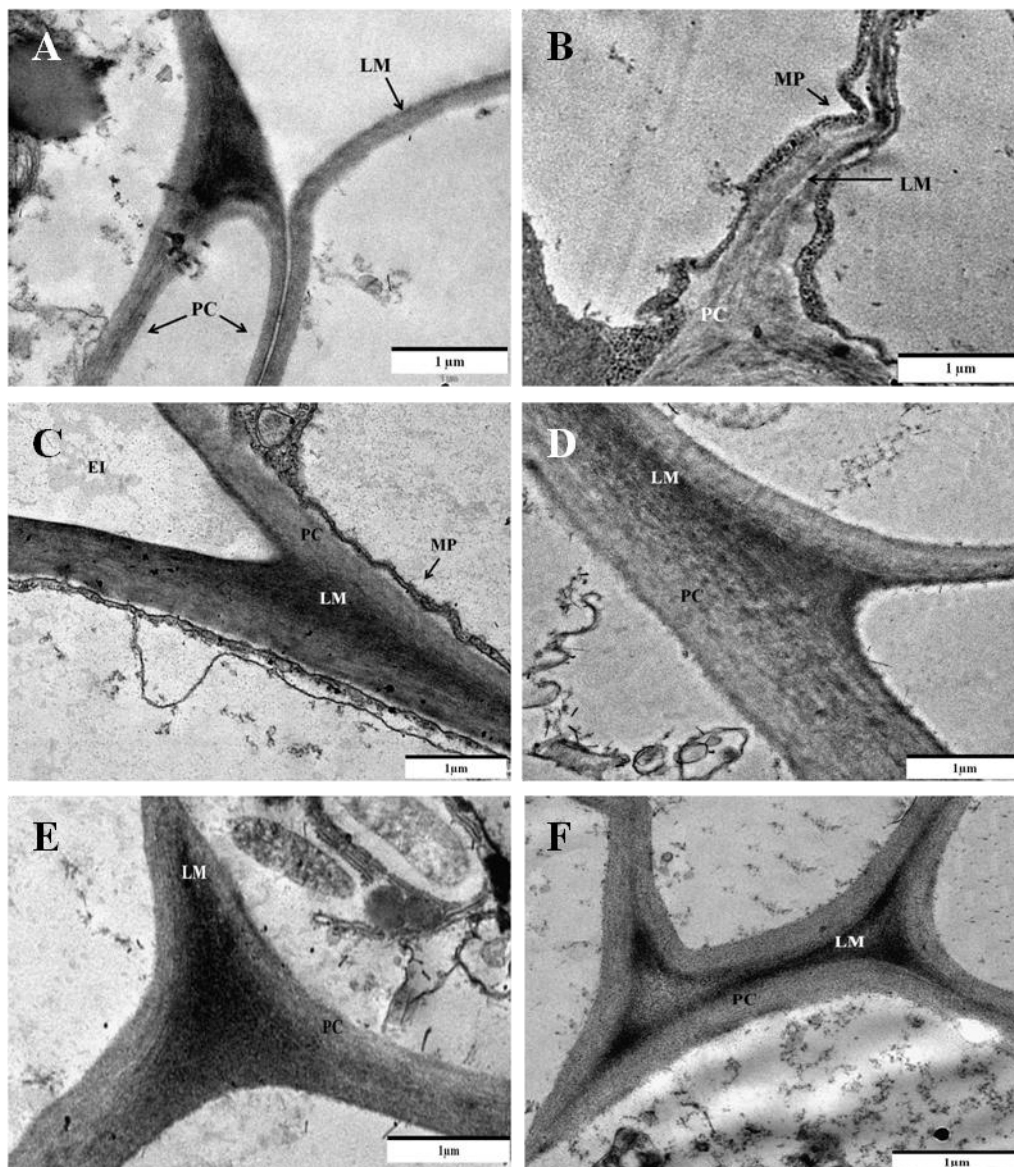
491

492 **Figura 3.** Microscopia de luz de folhas de couve-chinesa (*Brassica rapa* subsp.
 493 *pekinensis*). Sessão transversal do mesófilo foliar e detalhe da região superior do
 494 mesófilo: A-B planta controle; C-D plantas tratadas com $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2$ via
 495 pulverização foliar; E-F plantas tratadas com $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2$ via rega do solo; G-H
 496 plantas tratadas com $0,30 \text{ g L}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2$ via pulverização foliar; I-J plantas tratadas
 497 com $0,30 \text{ g L}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2$ via rega do solo. Estômatos (EST), espaço intercelular (EI),
 498 epiderme superior (ES), epiderme inferior (EIN), parênquima paliçádico (PP),
 499 parênquima esponjoso (PE), feixe vascular (FV), cloroplastos (C).



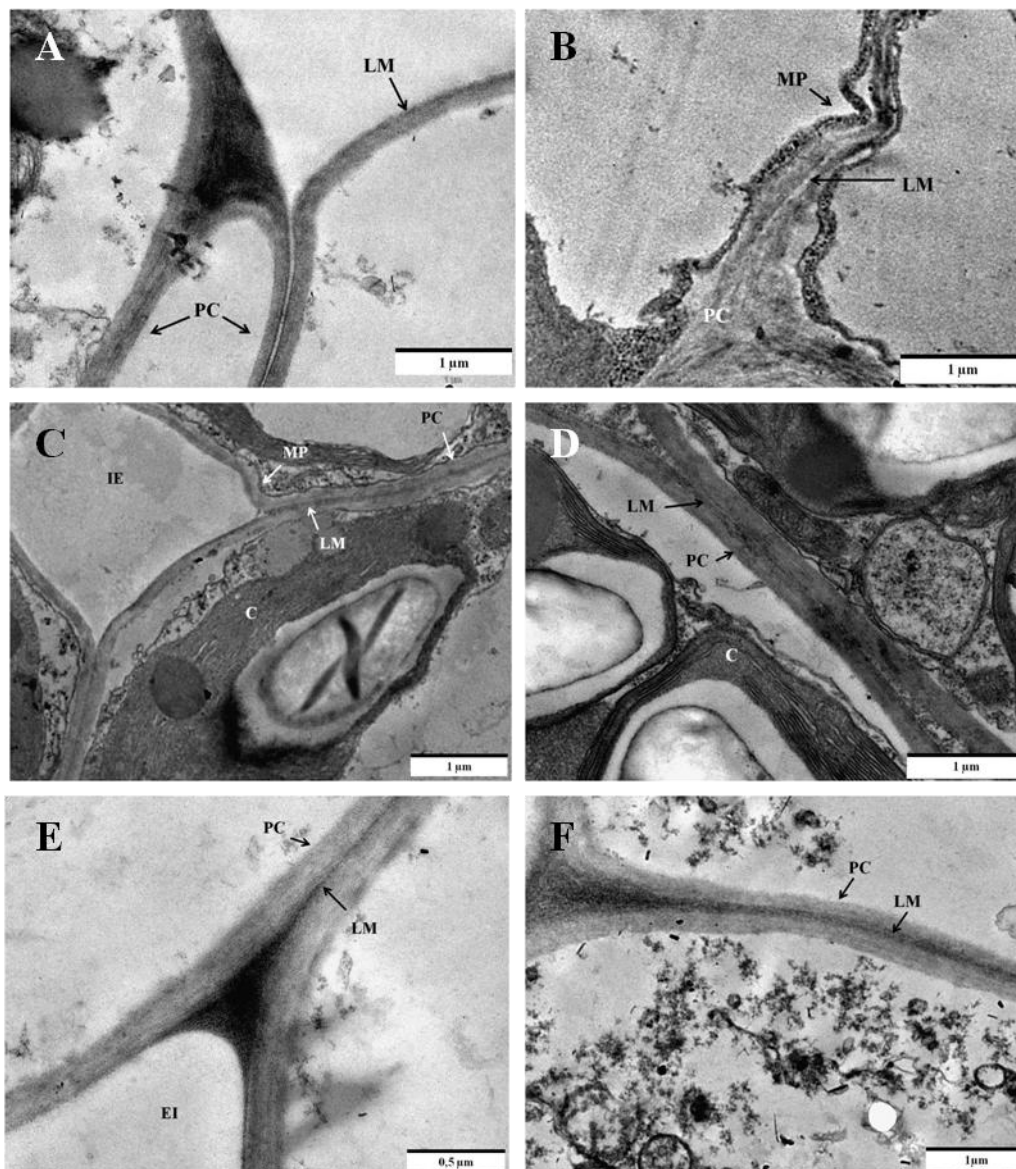
500

501 **Fig. 4.** Microscopia de luz de folhas de couve-chinesa (*Brassica rapa* subsp.
 502 *pekinensis*). Sessão transversal do mesófilo foliar e detalhe da região superior do
 503 mesófilo: A-B planta controle; C-D plantas tratadas com $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ via
 504 pulverização foliar; E-F plantas tratadas com $1,0 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ via rega do solo; G-H
 505 plantas tratadas com $5,0 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ via pulverização foliar; I-J plantas tratadas com $5,0$
 506 $\text{g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ via rega do solo. Estômatos (EST), espaço intercelular (EI), epiderme
 507 superior (ES), epiderme inferior (EIN), parênquima paliçádico (PP), parênquima
 508 esponjoso (PE), feixe vascular (FV), cloroplastos (C).



509

510 **Figura 5.** Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de folhas de plantas de
 511 couve-chinesa (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) tratadas com cálcio. Controle (A-B);
 512 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,15 \text{ g L}^{-1}$) pulverização via foliar (C) e rega do solo (D); $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($0,30 \text{ g}$
 513 L^{-1}) via pulverização foliar (E) e rega do solo (F). Parede celular (PC), lamela média
 514 (LM), membrana plasmática (MP), espaço intercelular (EI), cloroplasto (C).



515

516 **Figura 6.** Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de folhas de plantas de
 517 couve-chinesa (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) tratadas com cálcio. Controle (A-B);
 518 CaCl_2 ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) via pulverização foliar (C) e rega do solo (D); CaCl_2 ($5,0 \text{ g L}^{-1}$) via
 519 pulverização foliar (E) e rega do solo (F). Parede celular (PC), lamela média (LM),
 520 membrana plasmática (MP), espaço intercelular (EI), cloroplasto (C).

Capítulo II

Seleção de genótipos de alface com fonte de
resistência à podridão mole

Seleção de genótipos de alface com fonte de resistência à podridão mole **Kátia C. S. Felix · Willams J. Oliveira · Rosa L. R. Mariano · Elineide B. Souza**

Resumo A podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) é a principal fitobacteriose da cultura da alface no Brasil, por proporcionar grandes perdas na produção. Foram avaliados genótipos de alface quanto à reação à podridão mole, visando identificar fontes de resistência e analisar a estabilidade da resistência a diferentes isolados do patógeno. Dos 41 genótipos avaliados, 14 apresentaram reação de moderadamente resistentes quando inoculados com o isolado Pcc-C, com severidade variando de 3,5 a 4,0, enquanto 27 genótipos foram suscetíveis. Onze genótipos, quatro suscetíveis e sete moderadamente resistentes, foram selecionados para o ensaio de estabilidade da resistência em relação a três isolados do patógeno com diferentes níveis de virulência (Pcc-36, Pcc-A1.1, Pcc-23), . A maioria dos genótipos avaliados (77%) expressou a mesma reação do ensaio de seleção apenas em relação ao isolado Pcc-36, ou seja, reação suscetível (Veneza Roxa) e moderadamente resistente (Alface Grega, Mimosa Salad Bowl Roxa, Livia, Livinia, Salad Bowl, Vitória de Santo Antão e Saia Veia). Apenas o genótipo Vitória de Santo Antão manteve a reação de moderadamente resistente também para os isolados Pcc-A1.1 e Pcc-23. Esse genótipo pode ser utilizado como uma fonte promissora de resistência estável e durável contra a podridão mole.

Palavras-chaves: *Lactuca sativa*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, resistência genética, controle

K. C. S. Felix · W. J. Oliveira · R. L. R. Mariano · E. B. Souza (✉)

Laboratório de Fitobacteriologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil
e-mail: elineidebs@yahoo.com.br, fone: (55) 8133206211; fax (55) 8133206205

Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças folhosas mais consumidas no Brasil (Sala e Costa 2012), na forma de salada, sendo cultivada em todo o território

nacional. Atualmente encontra-se entre as seis hortaliças de maior importância econômica e a oitava em termos de volume produzido (Silva et al., 2010). Dentre as cultivares de alface, a mais importante em área cultivada e produção no Brasil é a do tipo Crespa, que representa cerca de 70% do mercado, seguida pelo tipo americana, com 15%, e pelas demais (lisa, mimosa e romana) que correspondem a 15% (Costa e Sala 2005). Porém, no Nordeste do Brasil, a preferência é por alface do tipo Lisa (Magalhães et al. 2010). Em Pernambuco, a produção concentra-se no município de Vitória de Santo Antão, na mesorregião da Mata Pernambucana, tendo sido comercializadas 127 toneladas dessa hortaliça em 2011 (CEASA-PE 2012).

O cultivo de alface ocorre em diferentes épocas do ano. Em condições de elevadas temperatura e umidade, tem sido verificada a ocorrência de doenças (Sala e Costa 2012), como a podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al..

A podridão mole é considerada a principal doença bacteriana em diversas culturas de importância econômica no Brasil e no mundo (Charkowski 2006), incluindo a alface (Raid 1997). A bactéria tem extensa distribuição geográfica e ampla gama de hospedeiros, podendo ser um fator limitante para a produção, ocorrendo desde a fase de pré-colheita até a comercialização (Pérombelon e Kelman 1980). No estado de Pernambuco-Brasil, as áreas plantadas com alface são normalmente submetidas a cultivos sucessivos durante todo o ano, podendo ser grandes as perdas causadas pela podridão mole. Um levantamento sobre a podridão mole realizado no ano de 2004, nas mesorregiões da Mata e Agreste de Pernambuco, constatou a prevalência da doença em 42,9% das áreas amostradas (Silva et al. 2007).

O controle da doença é dificultado, principalmente, pela ampla gama de hospedeiros (Jung et al. 2008) e sobrevivência da bactéria em restos de cultura no solo (Ren et al. 2001a). A alta variabilidade genética de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em áreas agrícolas, demonstrada por isolados provenientes de plantas de couve-chinesa de várias áreas de cultivo em Pernambuco (Alvarado et al. 2011), pode também impedir estratégias de controle e tem importantes implicações para o manejo da podridão mole.

O uso de cultivares resistentes é considerado o método de controle mais econômico e tecnicamente mais prático, devido ao seu baixo custo e à ausência de risco

potencial de resíduos agroquímicos no produto final e a resistência do patógeno a esses produtos (Costa et al. 2002).

Estudos anteriores têm confirmado a eficiência do uso de cultivares resistentes no controle da podridão mole para as culturas da batata (Benelli et al. 2004; Vitale et al. 2004), couve-chinesa (Ren et al. 2001b), mandinhoquinha-salsa (Henz et al. 2005) e *Zantedeschia* spp. (Snijder e Tuyl 2002). No entanto, nenhum relato sobre genótipos de alface resistentes a podridão mole foi encontrado.

Tendo em vista a importância socioeconômica dessa cultura para a mesorregião da Mata do estado de Pernambuco e a problemática da podridão mole como fator limitante para a produção em algumas áreas, este estudo teve como objetivo avaliar genótipos de alface quanto à reação à podridão mole, visando identificar fontes de resistência e analisar a estabilidade da resistência dos genótipos a diferentes isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Material e métodos

Obtenção dos isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Os isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* utilizados pertencem à Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e foram obtidos de plantas de couve-chinesa e alface com sintomas típicos de podridão mole.

Vinte isolados foram reativados da preservação em água pelo cultivo em meio CPG (1 g caseína hidrolisada, 10 g peptona, 10 g glicose, 18 g ágar, 1000 mL água destilada) por 48 h a temperatura de 28 °C. Colônias puras foram transferidas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio e, após 48 horas, procedeu-se ao teste de patogenicidade em frutos de pimentão verde, como descrito por Hyman et al. (2002). Os frutos foram colocados em câmara úmida e incubados a 28 °C, por 24-48 h, quando se procedeu a avaliação pela medição dos tamanhos das lesões.

Para uso nos experimentos foram selecionados quatro isolados com diferentes níveis de virulência, em ordem crescente, Pcc-36 (couve-chinesa), Pcc-C (couve-

chinesa), Pcc-A1.1 (alface crespa) e Pcc-23 (alface lisa). Esses isolados foram cultivados em meio CPG por 48 h, a temperatura de 28 °C. Após este período, água destilada esterilizada foi adicionada à placa de Petri contendo o crescimento bacteriano, e a concentração da suspensão foi ajustada em fotocolorímetro (Analyser[®]) a 570 nm onde $A_{570} = 0,36$ equivale a $1,0 \times 10^9$ UFC/mL.

Seleção de genótipos de alface resistentes à podridão mole

No presente estudo foram avaliados 41 genótipos de alface, sendo 40 cultivares comerciais e uma linhagem (Raider plus), que estão depositados no banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças, Brasília, Brasil (Tabela 1). Dentre os genótipos testados, Tainá foi utilizado como padrão de suscetibilidade à podridão mole (Silva et al. 2007). Esses genótipos foram testados quanto a sua resistência ao isolado Pcc-C de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Os genótipos de alface foram semeados em bandejas de poliestireno expandido com 200 células, contendo uma mistura de substrato (Basaplant[®]) e pó de coco 1:1 (v/v). vinte dias após o semeio, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de 5 L, contendo húmus e solo 1:2 (v/v).

Plantas aos 35 dias de idade foram inoculadas na base do pecíolo da segunda e terceira folhas definitivas pelo método de picada, que consiste no ferimento do tecido vegetal com alfinete entomológico a uma profundidade de 1 mm. Em seguida, 50 µL da suspensão bacteriana foram depositados no ferimento com o auxílio de um micropipetador (Mello et al. 2011). Após a inoculação, as plantas foram submetidas durante 12 h à câmara úmida, em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com quatro plantas, e o experimento foi conduzido duas vezes. As médias de temperatura e umidade relativa do ar foram de 27,5 °C e 70,5% para o experimento 1 e 26,27 °C e 76,2 % para o experimento 2.

As avaliações foram realizadas a intervalos de 12 horas até 96 h, observando-se a severidade da doença, estimada com o auxílio de escala descritiva de 1 a 9 (Ren et al. 2001a), 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 à morte e 9 = planta morta. Com as notas obtidas, os genótipos de alface foram agrupados em classes de reação da doença, adaptadas de Guerra et al. (2007), onde: 1,0 a 2,0 = resistente (R); 2,01 a 4,0 = moderadamente resistente (MR); 4,01 a 7,0 = suscetível (S); 7,01 a 9,0 = altamente suscetível (AS).

Análise da estabilidade da resistência de genótipos de alface à podridão mole

Foram analisados 11 genótipos de alface, selecionados do experimento anterior, com base na classe de reação à podridão mole, sendo quatro considerados suscetíveis (Veneza Roxa, Roxa Hortec, Alface Roxa (1) e Lucy Brown) e sete moderadamente resistentes (Alface Grega, Mimosa Salad Bowl Roxa, Livia, Livinia, Salad Bowl, Vitória de Santo Antão 14 Bl 1 e Saia Veia). Esses genótipos foram testados quanto à estabilidade da resistência à podridão mole quando inoculados com três isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, com níveis crescentes de virulência, Pcc-36, Pcc-A1.1 e Pcc-23. A produção das mudas de alface, a inoculação e a avaliação seguiram a metodologia descrita anteriormente. As médias de temperatura e umidade relativa do ar foram de 29,37 °C e 71,87 % durante o experimento 1 e 28,63 °C e 70,0 % durante o experimento 2. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 11 (genótipos) x 3 (isolados do patógeno), com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com quatro plantas. O experimento foi conduzido duas vezes e os dados obtidos foram analisados quanto aos pressupostos da análise de variância (ANOVA) e submetidos ao teste de comparação de médias (LSD - Least Significant Difference), ao nível de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa STATISTIX[®] (versão 9.0, Analytical Software, Tallahassee, USA).

Resultados

Seleção de genótipos de alface resistentes à podridão mole

Os dois experimentos conduzidos para avaliar a resistência dos 41 genótipos de alface apresentaram resultados similares, sendo os dados analisados conjuntamente. Os resultados mostraram que houve variação na reação dos genótipos à podridão mole (Tabela 1). Dos 41 genótipos avaliados, 14 apresentaram reação de moderadamente resistentes, com severidade variando de 3,25 a 4,0, enquanto 27 genótipos foram suscetíveis, com severidade de 4,05 a 5,53, incluindo o controle Tainá (Figura 1). Genótipos da maioria dos tipos de alface analisados (lisa, mimosa, crespa, americana) foram encontrados nas duas classes de reação, moderadamente resistente e suscetível, ou seja, não houve associação entre classe de reação e tipo de alface. Nenhum dos 41 genótipos testados apresentou reação do tipo imune (ausência de doença) ao isolado Pcc-C de *P. carotorovum* subsp. *carotovorum*.

Análise da estabilidade da resistência de genótipos de alface à podridão mole

No ensaio de estabilidade da resistência, não foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os 11 genótipos de alface quando o isolado menos agressivo foi usado (Pcc-36), embora os genótipos tenham sido agrupados em duas classes de reação, com média de severidade variando de 3,51 a 4,08 (Tabela 2). Verificou-se que Veneza Roxa permaneceu na classe suscetível, e sete genótipos (Alface Grega, Mimosa Salad Bowl Roxa, Livia, Livinia, Salad Bowl, Vitória de Santo Antão e Saia Veia) mantiveram-se na classe de moderadamente resistente, como observado no experimento de seleção inicial (Tabela 1). No entanto, três genótipos anteriormente classificadas como suscetíveis (Roxa Hortec, Alface Roxa (1) e Lucy Brown) tornaram-se moderadamente resistentes a Pcc-36. Quando inoculadas com o isolado Pcc-A1.1, somente a cultivar Vitória de Santo Antão manteve-se como moderadamente resistente, com severidade de 3,82. Os 10 genótipos restantes foram suscetíveis, com médias de severidade variando de 4,06-6,15 (Tabela 2). Quando o isolado mais agressivo (Pcc-23) foi utilizado, três classes de reação foram observadas. O genótipo Lucy Brown (Figuras 1C e 1D) foi altamente suscetível, com severidade de 7,74; nove outros genótipos foram suscetíveis, com médias que variaram de 4,84-6,71; e apenas o genótipo Vitória de Santo Antão (Figura 1A e 1B) apresentou reação do tipo moderadamente resistente, com média de 3,98. Considerando os três isolados dentro de

cada genótipo, apenas em Vitória de Santo Antão não foi verificada diferença significativamente ($P < 0,05$) quanto as reações apresentadas (Tabela 2). Portanto, este genótipo manteve a estabilidade, comportando-se como moderadamente resistente quando desafiado com os quatro isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* com diferentes níveis de virulência (Tabelas 1 e 2).

Discussão

A podridão mole é considerada uma das mais destrutivas doenças da cultura da alface, sendo um fator limitante para a sua produção em muitas áreas de cultivo de hortaliças no Brasil (Silva et al. 2007). Muitos genótipos (cultivares e/ou variedades) de alface foram descritos como resistentes a outras doenças, tais como míldio (*Bremia lactucae* Regel), mosaico (LMV, patótipo II) (Sala e Costa 2005),urchadeira (*Thielaviopsis basicola* Berk & Brome) (Sala et al. 2008), murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* Matuo & Motohashi) (Scott et al. 2010). Com relação à podridão mole, um transgênico de couve-chinesa expressando N-acil-homoserina lactonase mostrou alta tolerância à doença, pelo mecanismo de “quorum-quenching” (Vanjildorj et al. 2009). Em batata, a cultivar Asterix (Benelli et al. 2004) e os genótipos CS 90-164-13 e E 2121 (Vitale et al. 2004) foram identificados como menos suscetíveis e indicados como fontes de resistência. No entanto, inexistem genótipos de alface resistentes à podridão mole, o que justifica estudos em busca de fontes de resistência.

Reação moderadamente resistente à podridão mole foi encontrada em 34% dos 41 genótipos testados, dos quais fizeram parte cultivares da maioria dos tipos testados (lisa, mimosa, crespa, americana), embora genótipos destes mesmos tipos também tenham apresentado reação de suscetibilidade (Tabela 1). Esses resultados evidenciam que não existe uma associação consistente entre tipo de cultivar de alface e resistência ou suscetibilidade a podridão mole. No entanto, algumas pesquisas relacionam a reação de resistência a doenças ao tipo de alface (Sala et al. 2008; Sousa et al. 2002). Cultivares de alface do tipo crespa e batávia foram mais resistentes que os outros tipos à mancha bacteriana (Bull et al. 2007), enquanto os tipos crespa e lisa, foram resistentes e suscetíveis, respectivamente, aurchadeira (Sala et al. 2008). No Brasil, cultivares do tipo crespa representam 70% do mercado dessa hortaliça folhosa (Costa e Sala

2005), porém a maioria dos genótipos testados apresentou reação de suscetibilidade à podridão mole.

Henz et al. (2005), buscando genótipos de mandioquinha-salsa resistentes a podridão mole causada por *P. chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi*), verificaram que os genótipos apresentaram apenas variação no grau de suscetibilidade. O mesmo foi observado neste estudo, onde nenhum genótipo de alface apresentou reação tipo imune, apenas variaram quanto à suscetibilidade ao patógeno (Tabela 1). Não há cultivares com resistência ou imunidade à *Pectobacterium* spp., apenas variação no grau de suscetibilidade considerando o hospedeiro (Pérombelon e Salmond 1995). Níveis de resistência em espécies selvagens de batata a podridão mole foram associados a fatores ambientais como temperatura e precipitação anual, podendo também estar relacionados à plasticidade fenotípica da espécie. Essa variação na resistência à doença, provavelmente, é resultado da interação complexa entre planta, patógeno e ambiente, o que permite a planta sobreviver na presença do patógeno (Chung et al. 2011).

Alta variabilidade genética tem sido encontrada em populações de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, como constatado em estudo realizado em áreas produtoras de couve-chinesa no estado de Pernambuco, Brasil. Em Pernambuco, a grande diversidade de outras hortaliças cultivadas nas áreas de produção de alface, assim como plantas daninhas que podem ser hospedeiras alternativas, contribuem para os mecanismos de variabilidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Alvarado et al. 2011). Dessa forma, a combinação de resultados de experimentos, utilizando isolados do patógeno com diferentes níveis de virulência, torna a seleção de fontes de resistência à podridão mole mais viável sob condições de ocorrência natural da doença.

A maioria dos 11 genótipos avaliados (77%) expressou a mesma reação observada no ensaio de seleção apenas em relação ao isolado Pcc-36, enquanto a cultivar Vitória de Santo Antão foi a única que manteve a estabilidade da resistência em relação aos três isolados testados (Pcc-36, Pcc-A1.1 e Pcc-23) (Tabela 2). Essa falta de estabilidade na reação dos genótipos à podridão mole, em relação aos diferentes isolados do patógeno, pode estar relacionada a dois fatores: condições ambientais e virulência do patógeno.

Embora a temperatura média registrada no ensaio de estabilidade (29,0 °C) tenha sido mais elevada do que no de seleção (26,8 °C), a umidade relativa do ar durante a

seleção inicial foi mais alta (73,3 % versus 70,9%). Dessa forma, a combinação desses dois fatores não favoreceu a doença no ensaio de estabilidade, não sendo, portanto, responsável pelas diferenças na reação dos genótipos ao patógeno. Temperatura e umidade têm relação importante na densidade e dinâmica da população de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e conseqüentemente no desenvolvimento da doença (Moh et al. 2012).

A hipótese mais provável para explicar as divergências na suscetibilidade seria a variação nos níveis de virulência dos isolados, os quais foram selecionados com base na patogenicidade em frutos de pimentão verde, sendo em ordem crescente de virulência Pcc-36, Pcc-A1.1 e Pcc-23. Esta diferença na virulência ficou evidente na severidade da doença observada nas plantas de alface inoculados com os três isolados, sendo as maiores severidades obtidas com Pcc-23, inclusive com o genótipo Lucy Brown, classificado como altamente suscetível (Tabela 2).

As classes de resistência estabelecidas para diferenciar os genótipos de alface não se ajustaram perfeitamente à separação feita com base no teste LSD a uma significância de 5% (Tabela 2), porque os genótipos moderadamente resistentes não diferiram estatisticamente de genótipos suscetíveis. No entanto, as classes de resistência foram consistentes com as reações dos genótipos aos isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* com diferentes níveis de virulência.

Dos 11 genótipos testados, apenas Vitória de Santo Antão mostrou amplo espectro de moderada resistência aos diferentes isolados do patógeno, apresentando-se como uma fonte promissora de resistência estável e durável à podridão mole. A cultivar de alface Vitória de Santo Antão foi desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) para regiões tropicais. Apresenta características apreciadas pelos produtores, sendo uma planta vigorosa, com folhas grossas, tolerante ao calor e ao pendoamento precoce (Viggano 1990). Encontra-se entre as alfaces do tipo Lisa de maior preferência pelos consumidores da região Nordeste do Brasil (Magalhães et al. 2010) por suas características de folhas lisas, soltas e cor verde claro. Essa cultivar também é mencionada como tolerante à septoriose (Sousa et al. 2002).

Em levantamento realizado no ano de 2004, visando obter informações sobre a problemática da podridão mole em alface nas mesorregiões da Mata e Agreste do estado de Pernambuco, foi constatada incidência da doença variando de 0 a 22% nas 42 áreas

amostradas, sendo os menores valores obtidos em plantios de alface com a cultivares do tipo Lisa e Mimosa (Silva et al. 2007). Essa baixa incidência da doença mencionada acima pode estar relacionada à existência de resistência varietal, uma vez que a cultivar Vitória de Santo Antão (tipo lisa) é uma das mais plantadas no estado de Pernambuco e, de acordo com os resultados obtidos neste estudo foi moderadamente resistente à podridão mole.

Desta forma, a cultivar Vitória de Santo Antão poderá ser empregada em futuros programas de melhoramento genético, além de ser utilizada em áreas produtoras dessa hortaliça como uma alternativa na redução das perdas causadas pela podridão mole. A identificação de resistência em cultivares comerciais apresenta a vantagem de estas possuírem muitas características de interesse e poucas características indesejáveis, as quais em acessos de espécies selvagens, as quais necessitariam ser eliminadas em longos processos de seleção. No entanto, como Vitória de Santo Antão não apresentou reação imune, a combinação da resistência genética com práticas culturais de controle é necessária. Essas práticas incluem a remoção de plantas doentes e restos culturais, rotação de culturas e drenagem do solo, evitar ferimentos e efetuar adubação equilibrada, rica em cálcio.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo à Kátia C. S. Felix e de pesquisa à Rosa L. R. Mariano e Elineide B. Souza, a FACEPE pelo suporte financeiro (APQ 0583-5.01/08) e ao Dr. Ailton Reis (Embrapa Hortaliças) pela concessão dos genótipos de alface.

Referências

Alvarado ICM, Michereff SJ, Mariano RLR, Souza EB, Quezado-Duval AM, Resende LV, Cardoso E, Mizubuti ESG (2011) Characterization and variability of soft rot-causing bacteria in chinese cabbage in north eastern Brazil. *J Plant Pathol* 93:173-181

- Benelli AIH, Denardin ND, Forcelini CA, Duarte V (2004) Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. *Fitopatol Bras* 29:155-159
- Bull, CT, Goldman, PH, Hayes, R, Madden, LV, Koike, ST, Ryder, E (2007) Genetic diversity of lettuce for resistance to bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Health Progress* (online) doi:10.1094/PHP-2007-0917-02-RS
- Central de Abastecimento e Logística de Pernambuco-CEASA (2012) Dados de comercialização de produtos de alface. <http://www.ceasape.org.br/calend.php>. Acesso 15 nov 2012
- Costa RA, Rodrigues R, Sudré CP (2002) Resistência genética à mancha-bacteriana em genótipos de pimentão. *Hort Bras* 20:86-89
- Costa CP, Sala FC (2005) A evolução da alfaceicultura brasileira. *Hort Bras* 23:1 (artigo de capa)
- Charkowski AO (2006) The Soft Rot *Erwinia*. In: Gnanamanickam SS (ed) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, The Netherlands, pp. 423-505
- Chung YS, Holmquist K, Spooner DM, Jansky SH (2011) A test of taxonomic and biogeographic predictivity: Resistance to soft rot in wild relatives of cultivated potato. *Phytopathol* 101:205-212
- Filgueira FAR (2008) Asteráceas. Alface e outras folhosas. In: Filgueira FAR (ed) *Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna para produção de hortaliças*. 3ª ed. revista e ampliada. UFV, Viçosa, pp 300- 306
- Guerra ML, Abreu LM, Cardoso E, Mariano RLR (2007) Reação de cultivares de alface e couve-chinesa à podridão-mole. In: *Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE. Anais... Recife: UFRPE, 2007. CD-ROM.*
- Hyman LJ, Toth IK, Pérombelon MCM (2002). Isolation and identification, In: Pérombelon MCM, Van Der Wolf JM (eds). *Methods for the Detection and Quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on Potatoes: a Laboratory Manual, 2nd Ed, pp. 66-77. Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, UK.*

- Henz GP, Reifschneider FJB, Santos FF (2005) Reaction of arracacha genotypes to the root soft rot caused by *Pectobacterium chrysanthemi*. *Pesq Agrop Bras* 40:95-98
- Jung YJ, Choi CS, Park JH, Kang HW, Choi JE, Nou IIS, Lee YS (2008) Overexpression of the pineapple fruit bromelain gene (BAA) in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa*) results in enhanced resistance to bacterial soft rot. *Electron J Biotechnol*. doi: 10.2225/vol10-issue4-fulltext-5
- Magalhães AG, Menezes D, Resende LV, Bezerra Neto E (2010) Desempenho de cultivares de alface em cultivo hidropônico sob dois níveis de condutividade elétrica. *Hort Bras* 28: 316-320
- Mello MRF, Silveira EB, Viana IO, Guerra ML, Mariano RLR (2011) Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. *Hort Bras* 29:78-83
- Moh AA, Massart S, Jijakli MH, Lepoivre P (2012) Models to predict the combined effects of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers. *J Plant Pathol* 94:181-191
- Pérombelon MCM, Salmond GPC (1995) Bacterial soft rots. In: Singh US, Singh RP, Koshmoto K (ed) *Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases*. Pergamon, Oxford, pp.1-20
- Pérombelon MCM, Kelman A (1980) Ecology of the soft rot erwinias. *Ann Rev Phytopath, Palo Alto* 18: 361-387
- Raid RN (1997) Soft rot of lettuce. In: Davis RM, Subbarao KV, Raid RN, Kurtz EA (ed.) *Compendium of lettuce diseases*. APS Press, St. Paul, pp. 30-31
- Ren J, Petzoldt R, Dickson MH (2001a) Genetics and population improvement resistance to bacterial soft rot chinese cabbage. *Euphy* 117:197-207
- Ren J, Petzoldt R, Dickson MH (2001b) Screening and identification of resistance to bacterial soft rot in *Brassica rapa*. *Euphy* 118: 271–280
- Sala FC, Costa CP (2005) “PIRA ROXA”: cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. *Hort Bras* 23:158-159

- Sala FC, Costa CP, Teixeira LD, Fabri EG, Blat SF (2008) Reação de cultivares de alface a *Thielaviopsis basicola*. Hort Bras 26:398-400
- Sala FC, Costa CP (2012) Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. Hort Bras 30:187-194
- Silva AMF, Mariano RLR, Michereff SJ, Silveira EB, Medeiros FHV (2007) Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface e couve-chinesa em Pernambuco. Caatinga 20:84-93
- Silva MRL, Ribeiro P, Marineli R (2010) Programa nutricional para a cultura da alface. Campos & Negócios 5:100-101
- Sousa CS, Kerr WE, Haber LL, Dias RG, Silva FR, Takatsu A (2002) Avaliação de cultivares de alface quanto à resistência à septoriose nas condições de Uberlândia MG. Hort Bras 20: 2 (suplemento)
- Scott JC, Kirkpatrick SC, Gordon TR (2010) Variation in susceptibility of lettuce cultivars to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. Plant Pathol 59:139-146
- Snijder RC, van Tuyl JM (2002) Evaluation of tests to determine resistance of *Zantedeschia* spp. (Araceae) to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Eur J Plant Pathol 108:565–571
- Vanjildorj E, Song SY, Yang ZH, Choi JE, Noh YS, Park S, Lim WJ, Cho KM, Yun HD, Lim YP (2009) Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin. Plant Cell Rep Berlin 28:1581–1591
- Viggiano J (1990) Produção de sementes de alface. In: Castellane PD, Nicolosi WM, Hasegawa M (eds) Produção de sementes de hortaliças. FCAV/FUNEP, Jaboticabal, pp 1-13
- Vitale S, Alberino S, Zoina A, Parisi B, Corazza L (2004) Evaluation of resistance to dry and soft rot of potato clones adapted to Mediterranean regions. Phytopathol Pol 34:13–20

Tabela 1- Avaliação da resistência à podridão mole de genótipos de alface inoculados com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolado Pcc-C, em casa de vegetação

Genótipo	Severidade	Classe¹	Tipo²
Vitoria de Santo Antônio	3,25 ³	MR	Lisa
Elisa	3,47	MR	Lisa
Regina 255	3,65	MR	Lisa
Lívia	3,69	MR	Lisa
Mimosa Salad Bowl Roxa	3,68	MR	Mimosa
Livinia	3,70	MR	Mimosa
Salad Bowl	3,74	MR	Mimosa
CNPH 54 ³	3,79	MR	Americana
Olinda	3,92	MR	Crespa
Alface Grega	3,93	MR	Mimosa
Saia Veia	3,93	MR	Lisa
Mônica	3,96	MR	Crespa
Red Salad Bowl	3,99	MR	Crespa
Solavis	4,00	MR	Crespa
Simpson	4,05	S	Crespa
Verônica	4,07	S	Crespa
Red Salad Bowl Ultra Rosso	4,09	S	Mimosa
Imperial	4,11	S	Romana
Tainá	4,16	S	Americana
Mimosa Oak Leaf Green Pixie	4,16	S	Mimosa
Elba	4,16	S	Crespa
Vanda	4,19	S	Crespa
Amélia	4,25	S	Americana
Raider Plus	4,26	S	Americana
TPC 12047	4,30	S	Mimosa
18 BI I	4,30	S	Mimosa
Grandes Lagos	4,31	S	Americana
Angelina	4,40	S	Americana
Rafaela	4,41	S	Americana
Mimosa Salad Bowl	4,41	S	Mimosa

Tabela 1. Continuação...

Genótipos	SEV	Classe¹	Tipo
Scarlet	4,51	S	Crespa
Lucy Brown	4,53	S	Americana
Vanessa	4,54	S	Crespa
Amanda	4,59	S	Crespa
Alface Roxa (1)	4,60	S	Lisa
Kaiser	4,61	S	Americana
Cubana	4,65	S	Crespa
Roxa 9	4,74	S	Crespa
Alface Roxa (2)	4,95	S	Crespa
Roxa Hortec	5,16	S	Lisa
Veneza Roxa	5,53	S	Crespa
CV (%)	16,65		

¹Classes de reação da doença: 1,0 a 2,0 = resistente (R); 2,1 a 4,0 = moderadamente resistente (MR); 4,1 a 7,0 = suscetível (S); 7,1 a 9,0 = altamente suscetível (AS), adaptado de Guerra et al. (2007); ²Tipos Lisa e Crespa correspondem, respectivamente, a classificação solta lisa e solta crespa de Filgueira (2008);

³Média de 10 repetições.

Tabela 2. Estabilidade da resistência à podridão mole de genótipos de alface inoculados com três isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc-36, Pcc-A1.1 e Pcc-23), em casa de vegetação

Genótipo	Severidade ²		
	Pcc-36	Pcc-A1.1	Pcc-23
Veneza Roxa	4,08 ¹ aB	4,77 bB	6,71 abA
Roxa Hortec	3,98 a B	5,26 abA	6,15 bcA
Alface Roxa (1)	3,91 aB	6,15 aA	6,50 bA
Lucy Brown	3,84 aC	5,94 abB	7,74 aA
Alface Grega	3,84 aB	4,41 bcAB	5,23 cA
Mímisa Salad Bowl Roxa	3,75 aA	4,35 bcAB	5,32 cA
Lívia	3,71 aB	4,21 bcAB	4,94 cdA
Livinia	3,64 aA	4,26 bcAB	4,96 cdA
Salad Bowl	3,61 aB	4,18 bcAB	4,84 cdA
Vitória de Santo Antão	3,54 aA	3,82 cA	3,98 dA
Saia Veia	3,51 aB	4,06 bcB	5,23 cA

¹Média de 10 repetições. ²Severidade seguida pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de LSD a 5% de probabilidade.



Figura 1. Sintomas da podridão mole no genótipo Vitoria de Santo Antão, moderadamente resistente (A e B), e no genótipo Lucy Brown, susceptível (C e D). Sintomas 12 h (A e C) e 96 h (B e D) após a inoculação.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- Nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] nas concentrações de 0,15 e 0,3 g L⁻¹, aplicado via pulverização foliar e rega do solo, apresenta potencial para o controle da podridão mole em plantas de couve-chinesa;
- As plantas de couve-chinesa são capazes de assimilar cálcio quando suplementadas com 0,3 e 5,0 g L⁻¹ de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e CaCl_2 , respectivamente;
- Os tratamentos com cálcio propiciam aumento do número de cloroplastos, melhor estruturação do parênquima paliçádico e aumento de espessura da parede celular, principalmente no tratamento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 0,15 g L⁻¹, tanto via pulverização foliar como pela rega do solo.
- A maioria dos genótipos de alface avaliados apresenta reação de suscetibilidade à podridão mole;
- O genótipo Vitória de Santo Antão foi o único que mostrou estabilidade na resistência a doença a diferentes isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*;
- A cultivar Vitória de Santo Antão, pode vir a ser empregada em programas de melhoramento genético em pesquisas futuras, além de ser recomendada como uma alternativa na redução das perdas causadas pela podridão mole em áreas produtoras dessa hortaliça.