



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Caracterização epidemiológica da podridão mole em
couve-chinesa causada por *Pectobacterium
carotovorum* subsp. *brasiliensis* e uso de óleos
essenciais no controle da doença**

Beatriz Letícia Silva da Cruz

**Recife - PE
2020**

BEATRIZ LETÍCIA SILVA DA CRUZ

**Caracterização epidemiológica da podridão mole em
couve-chinesa causada por *Pectobacterium
carotovorum* subsp. *brasiliensis* e uso de óleos
essenciais no controle da doença**

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.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof^o. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Elineide Barbosa de Souza

**RECIFE-PE
JULHO- 2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

- 369c Cruz, Beatriz Letícia Silva da Cruz
Caracterização epidemiológica da podridão mole em couve-chinesa causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* e uso de óleos essenciais no controle da doença / Beatriz Letícia Silva da Cruz Cruz. - 2020.
98 f.
- Orientador: Marco Aurelio Siqueira da Gama.
Coorientador: Elineide Barbosa de Souza.
Inclui referências.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2020.
1. Brassica rapa var. pekinensis. 2. epidemiologia. 3. fatores determinantes de patogenicidade. 4. manejo alternativo.
5. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*. I. Gama, Marco Aurelio Siqueira da, orient. II. Souza, Elineide Barbosa de, coorient. III. Título

CDD 632

Caracterização epidemiológica da podridão mole em couve-chinesa causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasilensis* e uso de óleos essenciais no controle da doença

BEATRIZ LETÍCIA SILVA DA CRUZ

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 29/07/2020.

ORIENTADOR:

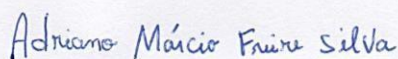


Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

EXAMINADORES:



Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes (IF Goiano)



Prof. Dr. Adriano Márcio Freire Silva (UFAL)



Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)



Prof. Dr. Humberson Rocha da Silva (UFRPE)

RECIFE - PE

JULHO - 2020

Aos meus pais, Flávio Cruz e Rosário Cruz pelo exemplo de vida, amor e dedicação. Aos meus irmãos Flávio Jr. e Rafaella, e a minha cunhada Jordana, pelo apoio, carinho, amor e incentivo.

OFEREÇO

A minha amada filha Maria Helena pelo incentivo, amor, paciência, e sobretudo por compreender a minha ausência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter me dado amor, perseverança, paciência e força para realizar mais esta etapa na minha vida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional, e a CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Marco Gama pelos ensinamentos, paciência, confiança, dedicação e orientação depositada durante o doutorado, meu muito obrigada.

À Professora Elineide Barbosa pelos ensinamentos, amizade, amor, confiança e por ser um exemplo de vida. Meus sinceros agradecimentos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia (PPGF) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelos conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários da Área de Fitossanidade: Darci Martins e Romildo Angeiras, pela ajuda e amizade despendida ao longo do curso.

À José Júlio, do centro de apoio à pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos meus queridos amigos: Greecy Mirian, Jessica Rafaelly, Emanuel Feitosa, Leandro Victor e Ângelo Alfredo pela amizade, companheirismo, e por sempre terem uma palavra amiga.

A meus amigos por todo companheirismo durante a execução deste trabalho Bárbara Ribeiro, Ana Dulce, Adriano, Claudeana, Pedro, Gabriele, Barbara Malta, Leandro Velez, Vitória e Paulo Souto Maior.

Aos meus companheiros de Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE: Alessandra Moraes, Ana Karolina Leite, Alba Suastes, Lucas Pontes, Lucas Nascimento, Lucas Amâncio, Marcelo, Roberto Farias e Bob por todos os momentos compartilhados dentro e fora do LAFIBAC, muito obrigado.

Ao senhor Luiz Coelho, pelo apoio durante os trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação.

A todos que participaram desta caminhada e contribuíram para a minha formação e realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO GERAL	8
GENERAL ABSTRACT	9
CAPÍTULO I Caracterização epidemiológica da podridão mole em couve-chinesa causada por <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> e uso de óleos essenciais no controle da doença	10
INTRODUÇÃO GERAL	10
Aspectos gerais da cultura da couve-chinesa	10
Podridão mole	11
Espécies de <i>Pectobacterium</i> causadoras de podridão mole e fatores de virulência	12
Aspectos epidemiológicos	16
Manejo da podridão mole	17
Uso de óleos essenciais no manejo de fitobacterioses	18
Referências	23
CAPÍTULO II Caracterização epidemiológica da podridão mole causada por <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> em couve-chinesa	39
Resumo	40
Introdução	41
Material e Métodos	43
Resultados	46
Discussão	49
Referências	52
CAPÍTULO III Efeito de óleos essenciais vegetais no crescimento, fatores de virulência de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i> e no manejo da podridão mole em couve-chinesa	67
Resumo	67
Introdução	68
Material e Métodos	70
Resultados	78
Discussão	81
Referências	85
CAPÍTULO IV	101
Conclusões gerais	101

RESUMO GERAL

A podridão mole é uma doença responsável por causar perdas significativas na produção de couve-chinesa no Brasil e no mundo. Diante disso, os objetivos do trabalho foram: (a) determinar a caracterização epidemiológica de cinco isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*); (b) avaliar a atividade antimicrobiana de sete óleos essenciais frente à isolados de (*Pcb*) em condições *in vitro* e *in vivo*. Para a determinação da caracterização epidemiológica, foram avaliadas concentrações de inoculo de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC mL⁻¹; temperaturas de 15, 20, 25, 30, 35, 40 ° C; câmara úmida durante 0, 6, 12, 24 e 48 h, com início de câmara úmida 0, 6, 12, 24 e 48 h. Foi observado que a temperatura ideal de crescimento *in vitro* para os isolados de *Pcb* foi de 24,7 °C. As condições que predispuseram a ocorrência de maior severidade da podridão mole em couve-chinesa foram elevadas concentração de inoculo (10^9 UFC/mL), em conjunto com temperatura de 30 °C e umidade relativa elevada, próxima a 100% durante 48 h. Esse é o primeiro estudo realizado para determinação dos fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento da podridão mole causada por *Pcb*. Foram utilizados os óleos essenciais de alecrim, bergamota, capim limão, cravo, citronela, eucalipto e laranja doce no controle da podridão mole. Todos óleos essenciais testados apresentaram atividade antimicrobiana e interromperam o desenvolvimento normal da formação do biofilme houve uma redução significativa na motilidade dos isolados CCRMPCB66 e CCRMPCB313 com as doses sub-MCIs dos óleos essenciais de alecrim e eucalipto, respectivamente. Porém, houve um aumento na motilidade para os isolados CCRMPCB18 com a exposição a doses sub-MCIs dos óleos de bergamota, capim limão, citronela e cravo, no isolado CCRMPCB642 com bergamota e laranja doce. Os óleos essenciais testados não alteraram a cinética de crescimento dos isolados. Quando foi utilizado a dose que representou a mínima dose bactericida de cada óleo essencial componentes epidemiológicos da podridão mole, os óleos de cravo, citronela, laranja doce, capim limão e eucalipto promoveram uma redução na severidade final da doença e na área abaixo da curva de progresso da doença. A análise por GC-MS revelou diferentes constituintes ativos nos óleos essenciais, destacando-se como os principais cânfora, limoneno, eugenol e mirceno, respectivamente, nos óleos essenciais de alecrim, citronela, cravo e capim limão. Os óleos essenciais estudados podem ser considerados agentes antibacterianos promissores para o manejo da podridão mole em couve-chinesa, indicando que atividade de compostos antimicrobianos à base de plantas é uma solução prática que pode ser incorporada a estratégia de manejo da doença.

Palavras-chave: *Brassica rapa* var. *pekinensis*, epidemiologia, fatores determinantes de patogenicidade, manejo alternativo, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

GENERAL ABSTRACT

Soft rot is a disease that causes significant losses in Chinese cabbage production in Brazil and worldwide. Therefore, aimed with the study: (a) determine the epidemiological characterization of five isolates of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcb) and (b) evaluate the antimicrobial activity of seven essential oils against Pcb isolates *in vitro* and *in vivo* conditions. In order to determine the epidemiological characterization were tested seven inoculum concentrations, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 and 10^9 CFU/mL, five different temperatures, 15, 20, 25, 30, 35.40 °C, and two wet chamber treatment, the duration time, 0, 6, 12, 24, and 48 h, and the beginning of the placement of the material in the wet chamber, at 0, 6, 12, 24, and 48 h. It was observed that the ideal *in vitro* growth temperature for (Pcb) isolates was 24.7 °C. The conditions that predisposed the increase severity Chinese cabbage soft rot were high inoculum concentration (10^9 CFU/mL), together with a temperature of 30 °C and high relative humidity, around 100% for 48 h. This is the first study to determine the favorable environmental factors to the development of soft rot caused by Pcb. All essential oils tested showed antimicrobial activity and interrupted the normal development of biofilm formation, with significant motility decrease of isolates CCRMPCB66 and CCRMPCB313 with the sub-MIC doses of rosemary and eucalyptus essential oils, respectively. However, there was a motility increase to the CCRMPCB18 isolates with exposure to sub-MIC doses of bergamot, lemongrass, citronella, and clove oils, in the CCRMPCB642 isolate with bergamot and sweet orange. The tested essential oils did not modify the growth kinetics of the isolates. When the CMB dose of each essential oil was used in the epidemiological components of soft rot, clove, citronella, sweet orange, lemongrass, and eucalyptus oils reduced the final severity of the disease and the area under the disease progress curve (AUDPC). The analysis by GC-MS revealed different active constituents in essential oils, standing out as the main camphor, limonene, eugenol, and mircene in the essential oils of rosemary, citronella, cloves, and lemon grass, respectively. The essential oils studied can be considered promising as an antibacterial agent for the soft rot control in Chinese cabbage, indicating that the activity of plant-based antimicrobial compounds is a practical solution that can be incorporated into strategic disease management.

Keywords: *Brassica rapa* var. *pekinensis*, epidemiology, pathogenicity determining factors, alternative management, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA PODRIDÃO MOLE EM COUVE-CHINESA CAUSADA POR *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* E USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA DOENÇA

INTRODUÇÃO GERAL

1. Aspectos gerais da cultura da couve-chinesa

A couve-chinesa (*Brassica pekinensis* L.) é uma hortaliça originária da China, introduzida no Brasil no século passado. Nos últimos anos, tornou-se firmemente estabelecida como uma importante cultura devido ao seu sabor e alto valor nutricional, sendo amplamente cultivada no Brasil e em outros países (NAMUR, 2008). Essa hortaliça é considerada uma excelente fonte de ácido fólico, vitaminas A, B e C, cálcio, potássio, minerais e fibras (ACIKGOZ, 2016; SANTI *et al.*, 2010; SILVA, 2010).

Pertencente à família Brassicaceae, a couve-chinesa é erroneamente chamada de acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*), a qual pertence à família Quenopodiaceae. Apresenta folhas com coloração variando de branco a creme, na parte interna, e de verde escuro a verde claro, na parte externa, com nervuras central destacadas, de coloração branca e espessas, que se fecham formando uma cabeça compacta, globular-alongada (HADLEY, 2003). Apresenta forma e tamanho diferentes entre as cultivares e caracteriza-se por ser uma planta de ciclo anual de 60 a 70 dias, com o peso que pode variar entre 1,4 a 4,5 kg (FILGUEIRA, 2000; FILGUEIRA, 2008).

Devido ao grande volume de produção, retorno econômico e valor nutricional (PERUCH *et al.*, 2006), a cultura é produzida o ano todo, principalmente no Nordeste brasileiro, destacando-se os municípios de Camocim de São Félix, Garanhuns, Vitória de Santo Antão e Chã Grande como os principais produtores dessa hortaliça no estado de Pernambuco (CEASA, 2020). No entanto, apesar da sua importância econômica os dados

de produção da couve-chinesa são escassos. De acordo com a Central de Abastecimento do Estado de Pernambuco (CEASA, 2020) a comercialização da couve-chinesa é crescente, com uma produção média anual de 132 toneladas entre os anos de 2014 a 2018. Contudo, esses dados são reflexos de uma ótima condição edafoclimática dessas regiões ao cultivo da couve chinesa, as quais apresentam características peculiares de clima, condições pluviométricas e tipo de solo.

As hortaliças de um modo geral são afetadas por diversas doenças, dentre elas aquelas causadas por bactérias, que são responsáveis pela baixa produtividade das culturas. Dentre as doenças de importância econômica que acometem a couve-chinesa, destaca-se a podridão mole, causada por espécies da família Enterobacteriaceae, principalmente aquelas pertencentes aos gêneros *Dickeya* e *Pectobacterium* (BERIAM, 2007).

2. Podridão mole

A podridão mole, ocasionada por bactérias do gênero *Pectobacterium*, é considerada a doença mais destrutiva e de ocorrência comum em muitas áreas produtoras de couve-chinesa no Brasil e no mundo (SILVA, 2005). As perdas econômicas causadas por essa doença podem variar de acordo com o valor da cultura, época de plantio, severidade do ataque, condições ambientais e das práticas aplicadas do cultivo à comercialização dos produtos (PÉROMBELON; KELMAN, 1980), resultando perdas significativas a cada ano (SONG *et al.*, 2013). A podridão mole afeta a couve-chinesa desde o campo até a pós-colheita, com danos que podem chegar até 100% da produção (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Em 2004, na mesorregião do Agreste do estado de Pernambuco foi constatada prevalência de 100% da podridão mole, em um total de 42 áreas amostradas,

com a incidência da doença variando de 1 a 67% (SILVA *et al.*, 2007), evidenciando a importância desta enfermidade no estado.

Os sintomas da podridão mole em couve-chinesa iniciam com a maceração dos tecidos na base das folhas e nervura, que estão em contato com o solo infestado, principalmente quando a planta está no final do ciclo. Após a penetração da bactéria através de ferimentos, ocorre a colonização e maceração do tecido vegetal (MELLO *et al.*, 2011), progredindo rapidamente para o caule principal, promovendo o colapso de toda a planta em alguns dias (REN, 2001).

A fonte de inóculo primário para o desenvolvimento da podridão mole são células bacterianas que sobrevivem como epifíticas na filosfera de plantas hospedeiras, como saprófitas no solo, em resíduos de plantas doentes ou em material de plantio (GOTO, 1992). A disseminação da bactéria ocorre facilmente pela água, raízes, insetos como *Plutella xylostella* L. e *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Rossmann *et al.*, 2018), tratos culturais, homem e principalmente por implementos agrícolas (TOKESHI; CARVALHO, 1980). Visto que a bactéria penetra por ferimentos, a incidência da doença aumenta quando as plantas são feridas em função de práticas culturais, ventos fortes, contato de plantas ou por insetos (GOTO, 1992).

3. Espécies de *Pectobacterium* causadoras de podridão mole e fatores de virulência

As espécies de *Pectobacterium* apresentam ampla distribuição em regiões temperadas e tropicais (GUSMESTAD; SECOR, 1983). Devido à ausência de especificidade, essas bactérias podem infectar uma ampla gama de hospedeiras, bem como uma mesma planta pode ser infectada por várias espécies ou subespécies deste grupo de fitobactérias (DE BOER *et al.*, 1987). Em função disso, o gênero

Pectobacterium se enquadra entre as dez fitobactérias mais nocivas do mundo (MANSFIELD *et al.*, 2012).

Além da couve-chinesa, são hospedeiras de *Pectobacterium* spp.: alface (*Lactuca sativa* L.) (NAZERIAN *et al.*, 2011), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.) (MORAES *et al.*, 2017), batata (*Solanum tuberosum* L.) (NABHAN *et al.*, 2013), batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) (GAO *et al.*, 2016), beterraba (*Beta vulgaris* L.) (SECOR *et al.*, 2016), berinjela (*Solanum melongena* L.) (CATARA *et al.*, 2001), cebola (*Allium cepa* L.) (WALERON *et al.*, 2014), cenoura (*Daucus carota* L.) (WALERON *et al.*, 2014); melancia (*Citrullus lanatus* L.) (MOLOTO *et al.*, 2007), nabo (*Brassica rapa* L.) (OSKIEIRA *et al.*, 2017), pepino (*Cucumis sativus* L.) (MENG *et al.*, 2017), pimentão (*Capsicum annum* L.) (GILLIS *et al.*, 2017), quiabo (*Abelmoschus esculentes* (L.) Moench) (NAZERIAN *et al.*, 2011), salsa (*Apium graveolus* L.) (WALERON *et al.*, 2014) e tomate (*Solanum lycopersicon* L.) (ROSSKOPF *et al.*, 2016). Adicionalmente, as perdas em cada cultura podem variar de acordo com as espécies e/ou subespécies envolvidas (JABUONSKY *et al.*, 1988).

De acordo com um levantamento realizado no ano de 2017 em diferentes zonas climáticas do estado de Pernambuco (Mata, Agreste e Sertão), com o objetivo de estudar a diversidade de bactérias causadoras de podridão mole em hortaliças, foi identificada a prevalência de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* ($\pm 36,2\%$) dentre 177 isolados coletados (MORAES, 2018).

P. carotovorum subsp. *brasiliensis* foi inicialmente detectada, causando danos em cultivos de batata, porém tem ocorrência em outros vegetais de importância econômica (Solanaceae, Cucurbitáceae e Brassicaceae) e plantas ornamentais. O primeiro relato dessa bactéria foi no Brasil em 2004, a partir de plantas de batata com sintomas de canela preta (EL-TASSA ; DUARTE, 2004). Desde então, tem sido relatada em regiões

geográficas (Europa, Ásia, África, Austrália, América do Norte). No entanto, é provável que tenha uma distribuição mais ampla (DICKY, 1979; MA, 2007; LEITE, *et al.*, 2014; NTUSHELO; MAFOFO, 2017; VAN DER WOLF *et al.*, 2017). A bactéria se adaptou a uma ampla gama de temperaturas e espécies hospedeiras, dentre elas a couve-chinesa, sendo considerada responsável por perdas significativas na China, África do Sul, Brasil, Holanda, Suíça e Reino Unido (MENG *et al.*, 2017; VAN DER WOLF, 2017). Sintomas causados por *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* são indistinguíveis de outras podridões mole causadas por espécies e subespécies de *Pectobacterium* e *Dickeya*, portanto, é impossível identificar esta espécie, com base em sintomas de campo (HYMAN *et al.*, 2001).

Isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* são Gram-negativos, móveis por flagelos peritríquios, anaeróbicos facultativos, quimiorganotróficos, possuindo crescimento ótimo na faixa de temperatura de 28 a 30°C, apresentam atividade oxidase negativa e catalase positiva, fermentam glicose, produzem β -galactosidase e H₂S, utilizam L-arabinose, D-galactose, glicerol, D-maltose, D-ribose e sacarose como fonte de carbono, mas não produzem urease e ácidos a partir de adonitol. As colônias em meio de cultura nutriente ágar são brancas acinzentadas, circulares, lisas, brilhantes, visíveis a partir de 24 h sob incubação a 25-30°C (SCHAAD *et al.*, 2001). Além dessas características, apresentam atividade pectinolítica em meio de cultura CVP (cristal-violeta-pectato) (CUPPELS; KELMAN, 1974), constituindo um critério auxiliar na identificação. Outra característica típica dessa fitobactéria é o aspecto de "vidro quebrado" em colônias jovens, após 24 a 48 h de cultivo a 28 °C em meio de cultura CPG (caseína ácida-peptona-glicose) (KELMAN; DICKY, 1995), através de visualização em lupa, mediante iluminação oblíqua (DUARTE; EL TASSA, 2003).

As espécies de *Pectobacterium* produzem enzimas denominadas de pectinases tais como pectato liase (Pel), pectina liase (Pnl), pectina metil esterase (Pme) e pectina acetil esterase (Pae), que são importantes fatores de virulência (DESS *et al.*, 2017; KADO, 2010). Essas enzimas são produzidas e exportadas por essas bactérias que apresentam a capacidade de causar maceração do tecido vegetal, resultando em colapso total da planta (AREMU; BABALOLA, 2015; KADO, 2010; LEE *et al.*, 2015; MARIANO *et al.*, 2005). A quantidade de enzimas pectinolíticas produzidas por bactérias desse gênero é nitidamente maior do que outras bactérias pectinolíticas, como por exemplo, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. (PÉROMBELON, 2002).

Além dessas enzimas, as bactérias causadoras de podridão mole também produzem celulasas e proteases. Tanto as enzimas pectinolíticas quanto as celulasas são secretadas pelo sistema de secreção tipo II (SSTII), enquanto as proteases são secretadas pelo sistema de secreção tipo I (SSTI) (HYTYIÄINEN, 2005; KADO, 2010), que degradam a lamela média das células, fazendo com que o tecido perca sua rigidez, ocasionando os sintomas de podridão mole (GOODMAN *et al.*, 1986). Adicionalmente, subsequentes fermentações e concomitante invasão do tecido em colapso por saprófitas ocasionam o desprendimento de gases com odor desagradável (ROMEIRO, 2005).

Outro importante fator de virulência em espécies de *Pectobacterium* é a formação de biofilmes (HOSSAIN; TSUTYUMI, 2006), os quais podem atuar como um fator de virulência em estágios iniciais de colonização e infecção (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Os biofilmes se caracterizam como uma associação de células microbianas aderidas (fixadas) a uma superfície biótica ou abiótica (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013). A presença de uma matriz no biofilme bacteriano oferece vantagens seletivas, como proteção contra variações ambientais, agregação bacteriana, fonte de nutrientes, barreira protetora, atividade enzimática, entre

outras (FLEMMING; WINGENDER, 2010), e a sua adesão e formação, pode ser limitada por fatores como expressão dos fatores de virulência e condições ambientais (CAIXETA, 2008).

A motilidade de *Pectobacterium* é realizada do movimento *swarming*, que caracteriza-se como um movimento multicelular de bactérias através da superfície esse movimento é realizado por meio de flagelos rotativos helicoidais fornecendo uma vantagem de sobrevivência sob uma grande variedade de ambientes, fazendo com que as bactérias respondam a condições favoráveis ou desfavoráveis para competirem com sucesso com outros microrganismos. (KEARNS; LOSICK, 2003 A motilidade também está envolvida também na formação de biofilme (DARNTON *et al.*, 2010).

4. Aspectos epidemiológicos

A epidemiologia e as estratégias de controle da podridão mole devem ser analisadas caso a caso, uma vez que subpopulações de isolados de uma determinada espécie podem diferir geneticamente das outras nas proximidades. Estudos que apontem o comportamento epidemiológico são de grande importância para fundamentar o desenvolvimento e a aplicação de medidas de controle para integrar o manejo de doenças de plantas. Assim devem ser definidos para cada associação patógeno-hospedeiro, a idade em que a planta hospedeira se torna mais suscetível, a faixa de temperatura a duração do molhamento foliar, bem como a concentração de inóculo adequada para o estabelecimento de altos níveis de doença, (SILVEIRA; MARIANO; MICHEREFF, 2004).

As variáveis epidemiológicas como severidade final e área abaixo da curva de progresso da doença, no caso da podridão mole em couve-chinesa, podem ser influenciadas de diferentes maneiras em função do isolado e quantidade de inóculo do

patógeno, da intensidade do ferimento no pecíolo, do genótipo, estágio fenológico do hospedeiro e das condições ambientais predominantes, e a espécie bacteriana envolvida (KIKUMOTO, 2000).

Diversos fatores ambientais contribuem para a maior severidade da podridão mole, porém a temperatura e a umidade são os que mais influenciam na epidemia (CAMPBELL *et al.*, 1990; VALE *et al.*, 2004). Contudo, não existem informações desse binômio para a podridão mole causada por isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, e informações escassas sobre a podridão mole causada por isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* indicam que a incidência e severidade mais elevadas da doença ocorrem em condições de temperatura de 30 °C e umidade relativa do ar próxima de 100% (BHAT *et al.*, 2010). O conhecimento das condições ambientais ideais para o desenvolvimento de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e da podridão mole é de grande importância para o entendimento da evolução da doença nas condições do estado de Pernambuco, pois esses isolados apresentam elevada prevalência neste estado (MORAES, 2018).

5. Manejo da podridão mole

O manejo da podridão mole é dificultado pela alta variabilidade genética das bactérias pectinolíticas (ALVARARO *et al.*, 2011), elevada capacidade de sobrevivência da bactéria fitopatogênica em resíduos de colheita no solo (REN; PETZOLDT; DICKSON, 2001; SILVA *et al.*, 2012) e pelo fato do patógeno possuir ampla gama de hospedeiros (JUNG *et al.*, 2008; KOH *et al.*, 2013).

De modo geral, as principais medidas preconizadas incluem evitar o plantio em solos de baixada, mal drenados; erradicação de plantas doentes; destruição de restos culturais; rotação de culturas de preferência com gramíneas, por um período de três a

quatro anos; evitar ferimentos durante tratamentos culturais; utilizar água de irrigação livre de contaminação; efetuar adubação equilibrada e rica em cálcio; e utilizar cloro na água de lavagem dos produtos (MARIANO *et al.*, 2001).

O controle químico por meio de antibióticos não é eficiente. Além disso, é considerado relativamente caro e não existe registro para a cultura estudada (AGROFIT, 2020). Esse método também não é desejável e ambientalmente seguro, devido à preocupação com o desenvolvimento de resistência e poluição ambiental (KAUR; GARG, 2014). Adicionalmente, a sociedade vem exigindo a redução do uso de substâncias que possam causar problemas ao homem e ao meio ambiente. Nesse sentido, há uma busca crescente por produtos que sejam ecologicamente corretos e ambientalmente seguros (BETTIOL, 2003). Portanto, diante das dificuldades de manejo da podridão mole da couve-chinesa, faz-se necessário o estudo do comportamento epidemiológico, visando a redução do inoculo e da doença, para minimizar os danos causados por *P. carotovorum* *sup.* *brasiliensis*.

5.1. Uso de óleos essenciais no manejo de fitobacterioses

Pesquisas focadas em bactericidas naturais derivados de plantas e suas possíveis aplicações na agricultura no controle de fitobacterioses estão sendo intensificadas, pois têm um potencial para inspirar e influenciar a pesquisa agroquímica moderna. Produtos vegetais de ocorrência natural e biologicamente ativos, como óleos essenciais (OE), podem ser uma fonte de classes alternativas de biopesticidas naturais para servir de modelo para compostos novos e mais eficazes no controle de fitobacterioses (GANMOR; MATTHEWS, 2003).

Os OEs são compostos líquidos, complexos, bioativos, com odor e cor característicos, sendo caracterizados como substâncias naturais, voláteis, límpidas

raramente coloridas, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com uma densidade geralmente mais baixa do que a água e constituídos por metabólitos secundários de plantas aromáticas (MORAIS, 2009; MORAIS; GONÇALVES; BETTIOL, 2009), obtidos a partir de diferentes órgãos, tais como, flores, folhas, sementes, rizomas e frutos (EL ASBAHANI *et al.*, 2015).

Eles são formados principalmente por classes de ésteres de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, terpenos, fenilpropanonas e álcoois aldeidados. Esses produtos e seus análogos são uma importante fonte para novos agroquímicos e apresentam potencial para serem utilizados no manejo de doença de plantas (SILVA; BASTOS, 2007; WOOD *et al.*, 2013). Além da ação direta, essas substâncias podem atuar na indução de resistência de plantas, devido suas características elicitoras (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2013).

São conhecidos aproximadamente 3000 OEs, dos quais 300 têm importância comercial para indústria farmacêutica, alimentícia, de cosméticos e perfumes e para a agricultura (BAKKALI *et al.*, 2008). Por sua vez, os OEs são considerados matérias de baixo custo, eficazes em doses muito baixas e não adversos à saúde humana e animal (GHALEM *et al.*, 2016). Quanto à ação, o uso de OEs já obteve resultados significativos tem sido promissores no controle de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (KNAAF; FIUZA, 2010; VIDO, 2009). Por sua vez, a eficácia do óleo vai depender de diversos fatores, dentre eles o fitopatógeno envolvido, o hospedeiro, o tipo de doença a ser controlada e os processos tecnológicos utilizados na obtenção e manipulação do produto (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007).

A atividade antimicrobiana de OEs é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade necessária do óleo para inibir o crescimento microbiano, esse valor é conhecido como concentração mínima inibitória (CMI) (MENEZES *et al.*, 2009). A

CMI é obtida através de várias técnicas, como diluição em placas ou microdiluição em tubos (OLIVEIRA *et al.*, 2009; CLSI, 2015), onde se determina a sensibilidade de um microrganismo a um determinado agente. Vários autores investigam os efeitos antimicrobianos dos OEs sobre o crescimento de bactérias fitopatogênicas, incluindo o gênero *Pectobacterium* (AMORIM *et al.*, 2011; BHARDWAJ; LAURA, 2008; EL-HEFNY *et al.*, 2017 ; HAJIAN-MALEKI *et al.*, 2019; IKEURA; KOBAYASHI, 2015; JOSHI *et al.*, 2015; KALU *et al.*, 2018 ; MEHRSOROSH *et al.*, 2014 ; NEZHAD *et al.*, 2012 ; PARADZA *et al.*, 2012 ; ZAIDI-YAHIAOUI *et al.*, 2008). Nesse contexto, os estudos têm indicado efeitos benéficos de OEs frente a fitopatógenos em diversos patossistemas. O óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na concentração de 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$, proporcionou redução de aproximadamente 91% da Área Abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) da antracnose da videira (GARCIA *et al.*, 2017). Resultados promissores também foram encontrados, com o uso de bergamota (*Citrus aurantium* var. *bergamia* L.) e capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapp) no manejo do míldio na videira (MAIA *et al.*, 2004) e do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus* L.) no controle de patógenos pós-colheita (ANTHONY *et al.*, 2003). Resultados positivos também foram encontrados em doenças de etiologia bacteriana, com óleo de copaíba (*Copaifera officinalis* Jacq. L.) couve-chinesa-podridão mole (GUERRA *et al.*, 2014), e com o óleo de *Eucalypto citriodora* no patossistema *Ralstonia*-bananeira (*Eucalyptus citriodora* (Hook.) K.D. Hill e L.A.S. Johnson) (AMORIM *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais compreendem uma ampla gama de compostos fitoquímicos cuja composição quantitativa é influenciada por vários fatores, como as diferenças genéticas entre as espécies utilizadas (fator determinante da composição e do conteúdo dos óleos essenciais), fatores ambientais, tipo do solo, condições de cultivo e estágio de maturidade, os quais podem afetar a atividade biológica dos óleos (JING *et al.*, 2014).

Esses compostos possuem propriedades antimicrobianas, agindo sobre a membrana bacteriana e no citoplasma (NAZARRO *et al.*, 2013; WOOD *et al.*, 2013). Adicionalmente, grande parte desses compostos são potenciais inibidores de *quorum sensing* (ESPINA *et al.*, 2015; KEREKES *et al.*, 2013).

A caracterização desses compostos pode ser determinada por vários métodos. No entanto, durante as duas últimas décadas, demonstrou-se que um dos métodos mais eficientes para o estudo da composição dos OEs é a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/MS) (STEFFENS, 2010). Nesse sentido, os compostos timol, carvacol e eugenol destacaram-se pela maior atividade antimicrobiana e ocorrência em diversos óleos essenciais agindo como inibidores da formação do biofilme e *quorum sensing* (BURT *et al.*, 2014; DEVI *et al.*, 2010; GUTIERREZ-PACHECO *et al.*, 2018; JOSHI *et al.*, 2016).

Estudos realizados com OEs de *Hymus vulgaris* L., *Pimpinella anisum* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck., *Ocimum asilicum* L., *Curcuma longa* L., *Ruta chalepensis* L. e *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake verificaram que o timol foi o composto responsável pelo elevado efeito antibacteriano sobre *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, caracterizando-se como um ingrediente ativo promissor no desenvolvimento de agroquímicos para o controle da doença (FERNANDEZ *et al.*, 2014). Similarmente, o efeito inibitório do carvacrol foi detectado sobre isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* em concentrações de 0,25 mM (JOSHI *et al.*, 2016). Lima (2016) estudando o efeito de 11 óleos essenciais no manejo da murcha bacteriana em tomateiro verificou que o eugenol foi o constituinte majoritário (87%), possuindo mesmo efeito na redução da doença que o óleo de cravo. Diante do exposto, fica evidente que o uso de óleos essenciais no manejo de doenças de plantas caracteriza-se como uma alternativa potencial e sustentável, com efeitos biológicos menos impactantes ao

ambiente, podendo ser utilizado de forma bem-sucedida no manejo da podridão mole da couve-chinesa provocada por isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

Tendo em vista a crescente importância da podridão mole como um fator limitante à produção de couve-chinesa no estado de Pernambuco, a inexistência de informações consistentes sobre as variáveis epidemiológicas da podridão mole provocada por isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, e a dificuldade de medidas efetivas no manejo da doença, o presente estudo teve como objetivos: (i) caracterizar os aspectos epidemiológicos, como influência da concentração de inoculo, temperatura, duração e início da umidade elevada, sobre a agressividade de cinco isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*; (ii) determinar as propriedades antibacterianas de sete óleos essenciais, bem como a influência sobre o crescimento de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis in vitro* e sobre os fatores ligados à virulência, como motilidade, formação do biofilme e secreção de enzimas degradadoras de paredes celulares; e (iii) avaliar a influência desses fitoquímicos no controle da podridão mole em couve-chinesa em condições de casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

- ACIKGOZ, F. E. Seasonal variations on quality parameters of pak choi (*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis* L.). **Advanced crop science and technology**, China. v. 4, n. 4, p. 233, 2016.
- ALVARADO, I. C. M.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA, E. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REZENDE, 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**, Netherland, v. 93, n. 1, p. 173-181, 2011.
- AMORIM, E P. P.; ANDRADE, F. W. R.; MORAES, E. M. S.; SILVA, J. C.; LIMA, R. S.; LEMOS, E. E. P. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, volume especial, p. 392-398, 2011.
- ANTHONY, S.; ABEYWICKRAMA, K.; AND WIJERATNAM, S. W. The effect of spraying essential oils *Cymbopogon nardus*, *C. flexuosus* and *Ocimum basilicum* on post-harvest diseases and storage life of Embul banana. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 78, n. 6, p. 780-785, 2003.
- AREMU, B. R.; BABALOLA, O. O. Classification and taxonomy of vegetable macergens. **Frontiers in Microbiology**, Suíça, v. 6, n.1, p.1-11, 2015.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Richmond, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BERIAM, L. O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. Palestra. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 81-84, 2007.
- BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias alternativas. In: CAMPANHOLA C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p. 191-216.

BHARDWAJ, S. K.; LAURA, J. S. **Antibacterial activity of some plant extracts against pathogenic bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Potato Journal**, India, v. 35, n.1, p. 72-77, 2008.

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

BURT, S. A., OJO-FAKUNLE, V. T., WOERTMAN, J.; VELDHUIZEN, E. J. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, e93414, 2014.

CAIXETA, D.S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008, 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

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

CATARA, V.; BELLA, P.; POLIZZI, G.; PARATORE, A. First report of bacterial stem rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* on grafted eggplant in Italy. **Plant Disease**, Saint. Paul, v. 85, n.8, p. 921, 2001.

CENTRAL DE ABASTECIMENTO DE PERNAMBUCO. Comercialização de produtos. Recife: **Central de abastecimento de Pernambuco**, 2015. Disponível em: <<http://www.ceasape.org.br/calend.php>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard- Tenth Edition**. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CUPPELS, D.; KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v.64, p.468-475, 1974.

DARNTON, N.C.; TURNER, L.; ROJEVSKY, S.; BERG, H. C. Dynamics of bacterial swarming. **Biophysical Journal**, v.98, n.10, p.2082-2090, 2010.

DE BOER, S. H.; VERDONCK, L. H.; P.; HARJU, H. O.; DE LEY, J. Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. **Journal of applied Bacteriology**, Oxford, v. 63, n. 6, p. 487-495, 1977.

DESS, M. W.; LYSOE, E.; ROSSMANN, S.; PERMINOW, J.; BRURBERG, M. B. *Pectobacterium polaris* sp. nov. isolated from potato (*Solanum tuberosum*). **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 67, n. 2, p. 5222-5229, 2017.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DICKEY, R. S. *Erwinia chrysanthemi*: A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. **Phytopathology**, Sait Paul, v. 69, p. 324-329, 1979.

DUARTE, V.; EL TASSA, S. O. M. Taxonomia do gênero *Pectobacterium*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 1-41, 2003.

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

EL ASBAHANIA, A.; MILADIC, K; BADRIC, W.; SALAC, M.; AIT ADDIB, E. H.; CASABANCAD, H.; EL MOUSADIKE, A.; HARTMANNA, D.; JILALEE, A.;

RENAUDA, F. N. R.; ELAISSARIC, A. Essencial oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.

EL-HEFNY, M.; ASHMAWY, N. A.; SALEM, M. Z. M.; SALEM, A. Z. M. Antibacterial activities of the phytochemicals-characterized extracts of *Callistemon viminalis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Conyza dioscoridis* against the growth of some phytopathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 113, p. 348-356, 2017.

EL-TASSA, S.O., DUARTE, V. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através da PCR-RFLP do gene recA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p.23-28, 2006.

ESPINA, L.; PAGAN, R.; LOPEZ, D.; GARCIA-GONZALO, D. Individual constituents from essential oils inhibit biofilm mass production by multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, Switzerland, v. 20, n. 6, p. 11357-11372, 2015.

FERNÁNDEZ, M. R. LÓPES. M. C.; PÉREZ, Y. S.; BRITO, D.; OCA, R. M.; MARTÍNEZ, Y.; PÉREZ. Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, **Revista Protección vegetal**, Cuba, v.29, n3, p.197-203, 2014.

FLEMMING, H.C; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, n.8, p. 623-633, 2010.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização e hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 421 p.

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

GAN-MOR, S.; MATTHEWS, G. A. Recent developments in sprayers for application of biopesticides: an overview. **Biosystems engineering**, Northumberland v. 84, n. 2, p. 119-125, 2003.

GAO, B.; WANG, R. Y.; CHEN, S. L.; MA, J.; LI, X. H. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* causing bacterial soft rot of sweet potato in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v.100, n.8, p. 1001776, 2016.

GARCIA, C.; HORST, M. V.; MAIA, A. J.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças da videira cultivar Cabernet Sauvignon. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.12, n. 4, p. 452-557, 2017.

GHALEM, B. R. Essential oils as antimicrobial agents against some important plant pathogenic bacteria and fungi. In: CHOUDHARY, D. K.; VARMA, A.; TUTEJA, N. (Eds.). **Plant-microbe interaction: Na Approach to sustainable agriculture**. Cingapura: Springer, 2016, p. 271-296.

GILLIS, A.; SANTANA, M. A.; RODRIGUEZ, M.; ROMAY, G. First report of bell pepper soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Venezuela. **Plant Disease**, Saint. Paul, v. 101, n.1, p.1671, 2017.

GOODMAN, R. N.; KIRALY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986. 433 p.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 342 p.

GUDMESTAD, N.; SECOR, G. The bionomics of *Erwinia carotovora* in North Dakota. **American Potato Journal**, New Brunswick, v. 60, p. 759-771, 1983.

GUERRA, M. L; GUERRA, Y. L.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. Essential plant oils in reducing the intensity of soft rot in Chinese cabbage. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 45, n. 4, p. 760-766, 2014.

GUTIERREZ-PACHECO, M. M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; MARTINEZ-TELLEZ, M. A.; LIZARDI-MENDOZA J.; MADERA-SANTANA, T. J.; BERNAL-

MERCADO A. T.; VAZQUEZ-ARMENA, F. J.; AYALA-ZAVALA, J. F. Carvacrol inhibits biofilm formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Food control**, Guildford, v. 89, p. 210-218, 2018.

HAIJIAN- MALEKI, H.; Ravari, S. B.; MOGHADDAM. Efficiency of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, causing potato soft and their possible application as coatings in storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 156, p.110928, 2019.

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

HYMAN, L. J, SULLIVAN, L., TOTH, I. K, PEROMBELON, M. C. M. Meio de pectato de violeta de cristal modificado (CVP) baseado em uma nova fonte de polipato (Slendid) para a detecção e isolamento de erwinias de podridão mole. **Potato Research**, Wageninge, v.44 n.3, p.265-270, 2001.

HOSSAIN, M. M.; TSUYUMU, S. Flagella-mediated motility is required for biofilm formation by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Journal of General Plant Pathology**, New York, v.72, n.1, p.34-39, 2006.

IKEURAH, I.; KOBAYASHI, F. Antimicrobial and antifungal activity of volatile extracts of 10 herb species against *Glomerella cingulata*. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 7, n. 9, p. 77, 2015.

JABUONSKY, R. E.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; TAKATSU, A. Influência da temperatura no dano causado por *Erwinia* spp. em tubérculos de batateira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 4, p. 317-319, 1988.

JING, L.; LEI, Z.; LI, L.; XIE, R.; XI, W.; GUAN, Y.; SUMNER, L. W.; ZHOU, Z. Antifungal activity of citrus essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Saint Paul, v. 62, n. 14, p. 3011-3033, 2014.

JOSHI, J. R.; KHAZANOV, N.; SENDEROWITZ, H.; BURDMAN, S.; LIPSKY, A.; YEDIDIA, I. Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in *Pectobacterium* and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. **Scientific Reports**, United Kingdom, v. 6, n.1, p.38126, 2016.

JOSHI, J. R.; BURDMAN, S.; LIPSKY, A.; YEDIDIA, I. Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 166, n. 6, p. 535-545, 2015.

JUNG, Y. J.; CHOI, C. S.; PARK, J. H.; KANG, H. W.; CHOI, J. E.; NOU, I. I. S.; LEE, Y. S. Overexpression of the pineapple fruit bromelain gene (BAA) in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa*) results in enhanced resistance to bacterial soft rot. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2008.

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

KALU, C. M.; KANU, S. A.; GANGIREDDYGA, V. S. R.; NTUSHELO, I. K. Effect of *Solanum mauritianum* leaf extract on the growth and morphology of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Bacillus subtilis*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 115, p. 289, 2018.

KAUR, H.; GARG, H. **Pesticide: Environmental Impacts and Management Strategies**. S. Solenski, ML Larramenday (Eds.) in: Efeitos tóxicos de pesticidas, Intech, Rijeka, Croácia, 2014.

KEARNS, D. B.; LOSICK, R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**. Cambridge, v.49, n.1, p. 581–590, 2003.

KELMAN A., E DICKEY R. S. **Detection of *Erwinia carotovora* and *E. chrysanthemi***. In: Saettler A.W., Schaad N.W., Roth, D.A. (eds). *Detection of Bacteria on Seed and Other Planting Material*, pp. 76-91. APS Press, Saint Paul, USA, 1995.

KEREKES, E. B.; DEÁK, É.; TAKÓ, M.; TSERENNADMID, R.; PETKOVITS, T.; VÁGOLGYI, C.; KRISCH, J. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of

selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 115, n. 4, p. 933-942, 2013.

KIKUMOTO, T. Ecology and biocontrol of soft rot of chinese cabbage. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 66, n. 3, p. 275-277, 2000.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v.5, n. 2, p. 120-132, 2010.

KOH, Y. J.; PARK, J. I.; AHMED, N. U.; JUNG, H. J.; KANG, K. K.; HUR, Y.; LIM, Y. P.; NOU, I. Enhancement of resistance to soft rot (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) in transgenic *Brassica rapa*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 136, n. 2, p. 317-322, 2013.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTFGREN, S.J. Bacterial biofilms: development, dispersal and therapeutic strategies in the dawn of the post antibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3. n. 4, p. a010306, 2013.

LEE, D. H.; LIM, J. A.; LEE, J.; ROH, E.; JUNG, K.; CHOI, K. SANGRYEOL RYU, C. O. H. S.; YUN, J.; HEU, S. Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage. **Microbiology**, Reading, v. 159, n. 7, p. 1487-1496, 2015.

LEITE, L. N. et al. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. **New Disease Reports**, Londres, v, 29, p. 24, 2014.

LIMA, M. A. G. **Óleos essenciais e silício para o controle da murcha bacteriana do tomateiro**. 2016, 89f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

MA, B. M. E. The host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n.3, p.1150–1163, 2007.

MAIA, A. J.; OLIVEIRA, J. S. B.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FARIA, C. M. R.; BATISTA, A. F.; COSTA, W. F.; BATISTA, B. N. The control of isariopsis leaf spot and downy mildew in grapevine cv. Isabel with the essential oil of lemon grass and the activity of defensive enzymes in response to the essential oil. **Crop Protection**, Guildford, v. 63, n. 9, p. 57-67, 2014.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGOEI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARITANUM, 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**, Oxford, v.13, n. 6, p. 614-629, 2012.

MARIANO, R. L. R.; SILVIEIRA, E. B. ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLVIERA, I. S.; NASCIMENTO, A. R. P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importancia no nordeste Brasileira In: MICHEREFF, S. J.; Barros, R. (Eds.) **Proteção de plantas na agricultura sustentavel** . Recife, 2001, p.141-169.

MEHRSOROSH, H.; GAVANJI, S.; LARKI, B.; MOHAMMADI, M. D.; KARBASIUN, A.; BAKHTARI, A. **Essential oil compositi *Pectobacterium carotovorum***. **Ninho Global**, v. 16, n. 1, p. 240-250, 2014.

MELLO, M. R. F.; SILVEIRA, E. B; VIANA, 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.

MENEZES, T. O. A.; ALVES, A. C. B. A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, A. F.; ALVES, B. P.; MENDONÇA, L. C. V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araçatuba, v. 38, n. 3, p. 184-191, 2009.

MENG, X.; CHAI, A.; SHI, Y.; XIE, X.; W.; MA, Z.; H, LI, B. Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, n. 1, p.79-87, 2017.

MOLOTO, V. M.; GOSZCZYNSKA, T. First report of watermelon soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in South Africa. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 103, n. 1-2, p.12-13, 2007.

MORAES, A.J.G. **Diversidade de bactérias causadoras de podridão mole em hortaliças no estado de Pernambuco**, 2018, 109f, tese (doutorado em fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- PE, 2018;

MORAES, A. J. G., SOUZA, E. B., MARIANO, R. L. R., SILVA, A. M. F., LIMA, N. B., PEIXOTO, A.R., GAMA, M. A. S. First report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing soft rot of *Cucurbita pepo* in Brazil. **Plant disease**, Saint Paul, v.101, n.2, p.379, 2017.

MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 139-152.

MORAIS, L. A. S.; GONÇALVES, G. G.; BETTIOL, W. Óleos essenciais no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 17, n.1. p. 257-304, 2009.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ALVARADO, I. C. M.; SILVA, A. M. F. 2005. Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 2, n. 1, p.121-153, 2005.

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

NAMUR, R. T. **Influência do tamanho de muda na ocorrência de mancha de alternaria em diferentes híbridos de couve-chinesa, nas estações de inverno e verão**. 2008, 33f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2008.

NAZERIAN, E.; SIJAM, K.; ABIDIN, M. A. Z.; VADAMALAI, G. First report of lettuce soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Malaysia. **Journal of Plant Pathology**, Nazerian, v. 93, n. 4, p. 77, 2011.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Reino Unido, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NEZHAD, M.H.; ALAMSHAHI, L.; PANJEHKEH, N. Biocontrol efficiency of medicinal plants against *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*. **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 3, n.1 p. 46-51, 2012.

NTUSHELO, K.; MAFOFO, J. Draft genome of a South African strain of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. **Brazilian journal of microbiology**, Piracicaba, v. 48, n. 1, p. 11-12, 2017.

OLIVEIRA, T. F.; FERREIRA, J. S.; BOA SORTE, P. M. F.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. **Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 16 p.

OSKIERA, M.; KALUZNA, M.; KOWALSKA, B.; SMOLINSKA, U. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* on cabbage and Chinese cabbage: identification, characterization, and taxonomic relatedness of bacterial soft rot causal agents. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 99, n. 3, p. 149-160, 2007.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 2005. 417 p.

ROSSMANN, S.; DESS. MERETE, W.; PERMINOW, J.; MEADOW, R.; BRUBERG, M.B. Soft rot *Enterobacteriaceae* are carried by a large range of insect species in potato fields. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 84, n. 12, e00281-18, 2018.

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.

ROSSKOPF, E.; HONG, J. First report of bacterial stem rot of “heirloom” tomatoes caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 6, p. 1233, 2016.

SANTI, A.; CARVALHO, M. A. C.; CAMPOS, O. R.; SILVA, A. F.; ALMEIDA, J. L.; MONTEIRO, S. Ação de material orgânico sobre a produção e características comerciais de cultivares de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 87-90, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 554-556, 2003.

SCHAAD, N.W., JONES, J. B.; CHUN, W. (Eds.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. Saint Paul. American Phytopathological Society, 2001.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial.** 2010, 44f. Dissertação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SONG, G. C.; RYU, S. Y.; KIM, Y. S.; LEE, J. Y; CHOI, J. S. Elicitation of resistance induced against *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae* by specific individual compounds derived native Korean plant species. **Molecules**, Basileia, v. 18, n. 10, p. 12877-12895, 2013.

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

SILVA, A. M. F.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; SILVEIRA, E. B.; MEDEIROS, F. H. V. Survey of the intensity of soft rot on lettuce and Chinese cabbage in Pernambuco. **Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 1, p. 84-93, 2007.

SILVA, J. M. **Acelga e suas propriedades**. 2010. Disponível em: <<http://soverduras.blogspot.com/2010/05/accelga-e-suas-propriedades.html>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p.189-196, 2007.

SILVA, C. L.; SOUZA, E. B.; FELIX, K. C. S.; SANTOS, A. M. G.; SILVA, M. V. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão mole em alface crespa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 632-638, 2012.

SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 0-34, 2004.

PARADZA, V. M.; ICISHAHAYO, D.; NGADZE, E. Efficacy of botanical extracts from garlic and neem on controlling potato soft rot pathogens. **Journal of Agriculture**, Kwaluseni, v.16, n. 1, p. 1-10, 2012.

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

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

PERUCH, L. A. M.; MICHEREFF, S. J.; ARAÚJO, I. B. Levantamento da intensidade da alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4. p. 464-469, 2006.

TOKESHI, H.; CARVALHO, P. C. T. Doenças do tomateiro - *Lycopersicon esculentum* Mill. In: GALLI, F. (Coord.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 2ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, p. 236-250.

VAN DER WOLF, J. M, HAAN, E. G DE, KASTELEIN, P., KRIJGER, M., H.A.A.S, BH DE, VELVIS, H., MENDES, O., KOOMAN-GERSMANN, M., ZOUWEN, P.S Virulência de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* na batata comparado com o de outras espécies de *Pectobacterium* e *Dickeya* em condições climáticas prevalentes na Holanda. **Plant Pathology**, Pisa, v.66, n.4, p.571-583, 2017.

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

VIDO, D. L. R. **Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. Provenientes da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica)**. 2009. 101f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretariado Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

WALERON, M.; WALERON, K.; LOJKOWSKA, E. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 139, p. 457-469, 2014.

WOOD, E. M.; MILES, T. D.; WHARTON, P. S.; The use of natural plant volatile compounds for the control of the potato postharvest diseases, black dot, silver scurf and soft rot. **Biological Control**, Texas, v. 64, n.2, p. 152-159, 2013.

ZAIDI-YAHIAOUI, R.; ZAIDI, F.; BECHAR, S. Effect of *Olea europaea* L and *Salvia officinalis* leaves phenolics extracts on potato tubers soft rot disease. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74, n. 9, 2008.

CAPÍTULO II

Caracterização epidemiológica da podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* em couve-chinesa

Caracterização epidemiológica da podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* em couve-chinesa

CRUZ, B. L. S.¹; ASSUNÇÃO, E. F.¹; SANTOS, L. V. S.¹; SANTOS, L. N.¹; CONCEIÇÃO, C. S.¹; SOUZA, E. B.²; GAMA, M. A.

S¹

¹Departamento de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel, s/n, Dois Irmãos, CEP 52.171-900, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor para correspondência: beatrizleticia@live.com

Resumo

A podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*) é responsável por causar perdas significativas na produção de diversas hortaliças no Brasil e no mundo. Sob condições ambientais favoráveis os danos de rendimento podem chegar até a 100% em campos de produção de couve-chinesa, justificando assim, a importância dos estudos epidemiológicos, para o entendimento do desenvolvimento da doença. Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho, determinar a influência da temperatura *in vitro* no crescimento de cinco isolados de *Pcb*, e analisar a influência da temperatura, concentração de inóculo, duração e início da umidade relativa do ar elevada sobre a severidade da doença. Foi observado que a temperatura ideal de crescimento *in vitro* para os isolados de *Pcb* foi de 24,7 °C. Para todos os isolados, as condições que predisuseram a ocorrência de uma maior severidade da podridão mole em couve-chinesa foram elevadas concentrações de inóculo (10⁹ UFC/mL), em conjunto com a temperatura de 30 °C e umidade relativa do ar elevada, próxima a 100%, durante 48 h. Esse é o primeiro estudo realizado para determinação dos fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento da podridão mole causada por

Pcb em couve-chinesa. Além do mais, o conhecimento aqui obtido auxiliará o entendimento de epidemias da podridão mole e o desenvolvimento de estratégias eficientes para o manejo da doença.

Palavras-chave: Fatores ambientais, concentração de inoculo, severidade, *Brassica rapa* var. *pekinensis*

INTRODUÇÃO

A couve-chinesa (*Brassica pekinensis* L.) apresenta importância econômica e alimentar significativa, pois é fonte de vitaminas, sais minerais e fibras (Cardoso et al. 2017). Essa espécie pertence à família Brassicaceae, sendo erroneamente chamada de acelga, que é uma hortaliça pertencente à família Amaranthaceae (Matos et al. 2010). Devido ao grande volume de produção, retorno econômico propiciado, valor nutricional (Peruch et al. 2006) e adaptação às condições edafoclimáticas, a couve-chinesa é produzida em grande quantidade no Nordeste brasileiro. De acordo com dados do Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA-PE), no ano de 2018, foram comercializados no estado de Pernambuco aproximadamente 1.742 toneladas de couve-chinesa, sendo os principais produtores no estado, Camocim de São Félix, Garanhuns, Vitória de Santo Antão e Chã Grande.

A podridão-mole, causada por Enterobactériaceas, é considerada a doença mais destrutiva e importante em muitas áreas produtoras de couve-chinesa no Brasil e no mundo, ocasionando uma redução na produtividade (Silva et al. 2007), com perdas de até 100% da produção em condições de campo demonstrando a importância da podridão mole para essa cultura.

Em Pernambuco a podridão mole é considerada um sério problema para a produção de couve-chinesa (Felix et al. 2017). O Agreste pernambucano, em 2004, foi constatada prevalência de 42,9% da podridão mole em alface e 100% em couve-chinesa, em um total de 42 áreas amostradas nessa região, com a incidência da doença variando de 0 a 22% em alface e 1 a 67% em couve-chinesa (Silva et al. 2007).

Devido à ausência de especificidade, a couve-chinesa pode ser infectada por diferentes gêneros, espécies ou subespécies de fitobactérias pectinolíticas. As espécies *Pectobacterium atrosepticum*, *P. betavascularum*, (De Boer et al.1987), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, (Ren et al. 2001), *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Seo et al. 2004), *P. aroidearum* (Barroso et al. 2019), *P. wasabiae* (Golkhandan et al. 2013) e *Pantoea agglomerans* (Guo et al. 2020) foram detectadas causando podridão mole em couve-chinesa. No entanto, em levantamento realizado para estudar a diversidade de bactérias causadoras de podridão mole no estado de Pernambuco, a maioria dos isolados coletados causando podridão mole na cultura foram identificados como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, constatando-se a elevada agressividade dessa fitobactéria a couve-chinesa (Moraes, 2018).

A disseminação da bactéria pode ocorrer facilmente pela água, raízes, insetos, tratos culturais, homem e principalmente por implementos agrícolas (Tokeshi e Carvalho 1980). Visto que a bactéria penetra por ferimentos, a incidência da doença aumenta marcadamente quando as plantas são feridas em função de práticas culturais, ventos fortes, contato entre plantas doentes e sadias ou ação de insetos (Goto, 1992). Após a penetração, a bactéria coloniza o tecido vegetal produzindo pectinases, que são enzimas que degradam a lamela média das células, fazendo com que o tecido perca sua rigidez, ocasionando o sintoma de podridão mole (Goodman et al. 1986). Adicionalmente, subsequentes fermentações e concomitante invasão do tecido em colapso por microrganismos saprofitos ocasionam o desprendimento de gases com odor desagradável (Romeiro, 2005).

O conhecimento dos efeitos das variáveis epidemiológicas é de suma importância para traçar estratégias mais eficientes de controle (Zambolim et al.2014). A temperatura e umidade na superfície da planta são os fatores ambientais que afetam mais intensamente o início e o progresso de doenças infecciosas (Silveira et al. 2004). Além disso, a obtenção de informações sobre o comportamento das doenças em função da faixa de temperatura e do período de exposição à umidificação, sendo indispensável na fase de penetração, infecção, sobrevivência e disseminação

das fitobactérias pectinolíticas (Lopes et al. 2007), e após a penetração, dependendo da temperatura, a presença de água livre conduz rapidamente à anaerobiose dentro do órgão infectado (Burton, 1970). Outro fator de suma importância no processo infeccioso é a quantidade de inoculo viável, cujo aumento da concentração normalmente tende ao aumento do nível da doença (Oliveira et al. 2014). O conhecimento das condições ambientais, que seja favorável para o desenvolvimento de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e da podridão mole é de suma importância para o entendimento da evolução da doença em determinadas condições climáticas e agrícolas de uma região. Portanto, como não existem informações consistentes sobre o comportamento da podridão mole causada por isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* em couve-chinesa, o objetivo desse estudo foi analisar a influência da concentração de inoculo, temperatura e duração e início da umidade na agressividade de cinco isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* na couve-chinesa.

Matérias e Métodos

Isolados bacterianos, condições de cultivo e preparo de suspensões

Os cinco isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (CCRMPCB18, CCRMPCB66, CCRMPCB313, CCRMPCB362 e CCRMPCB642), pertencentes à Coleção de Cultura Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de Fitobacteriologia (LAFIBAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), foram selecionados com base em ensaios anteriores quanto a patogenicidade, e apresentaram diferentes níveis de agressividade em couve-chinesa e pimentão. A descrição das principais características dos isolados encontra-se na Tabela 1. Exceto especificado, todos os isolados foram retirados da preservação em água e cultivados em meio NYDA (10 g L⁻¹ de dextrose; 5 g L⁻¹ de extrato de levedura; 3 g L⁻¹ de extrato de carne; 5g L⁻¹ de peptona; 20 g L⁻¹ de ágar) e mantidos em B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) a 28 °C por 48 h. Em todos os experimentos realizados, as suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro

(Analyser 500 M, Brasil) para $A_{570} = 0,36$ que corresponde a 10^9 UFC mL⁻¹. Tween 80 1% (1:1) foi adicionado a suspensão bacteriana.

Temperatura ideal de crescimento *in vitro* dos isolados

Para a determinação da temperatura ideal de crescimento *in vitro*, alíquotas de 0,5 ml das suspensões bacterianas foram depositadas em tubos de ensaio de 10 mL, contendo 4,5 mL de meio de cultura líquido NYD (NYDA sem ágar). Tubos tratados similarmente com água destilada esterilizada (ADE) foram utilizados como controle negativo. Os tubos com as suspensões foram mantidos em estufas B.O.D nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C, durante um período de 48 h. Após a incubação, a absorbância das suspensões foi avaliada em espectrofotômetro a 570 nm. Cada isolado foi considerado um tratamento e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x9 (cinco isolados e nove temperaturas) com cinco repetições, sendo uma repetição constituída por tubo de ensaio.

Efeito da temperatura na severidade da podridão mole

Os isolados foram inoculados em nervuras centrais de folhas de couve-chinesa com o limbo foliar removido. Com auxílio de um alfinete entomológico, foram realizados furos de 2,5 mm de profundidade em dois pontos equidistante na nervura e sobre os ferimentos foram depositados 10 µL das suspensões bacterianas. Como controle negativo foram utilizadas nervuras tratadas similarmente com ADE. Após a inoculação, as nervuras foram dispostas sobre placas de Petri, as quais foram acomodadas dentro de bandejas de plástico recobertas com sacos plástico transparentes para criação de uma câmara úmida e incubadas por 48 h em B.O.D. nas temperaturas de 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C. As avaliações foram realizadas em intervalos de 6 h durante 48 h, determinando-se a severidade da doença pela medição das lesões com auxílio de um paquímetro digital (Lee 150mm 0,1 mm.). Com os dados de severidade calcularam-se para cada isolado os valores de Área Abaixo

da Curva de Progresso da Doença (AACPD), pela expressão: $AACPD = \sum(y_i + y_{i+1})/2 \cdot dt_i$, onde y_i e y_{i+1} são valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas e dt_i e o intervalo entre as avaliações (Shaner e Finner 1977) e a severidade final (SF) da doença. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 6 (cinco isolados e seis temperaturas) e quatro repetições, sendo cada repetição uma nervura contendo dois pontos de inoculação.

Efeito da concentração de inoculo na severidade da podridão mole

As concentrações das suspensões bacterianas foram ajustadas para 10^9 UFC mL⁻¹ e, em seguida, foram realizadas diluições de forma seriada até a concentração de 10^4 UFC mL⁻¹. A inoculação das suspensões bacterianas (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC mL⁻¹). E as avaliações foram realizadas conforme descrito anteriormente. A incubação foi realizada em B.O.D à temperatura de 30 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5x6 (com cinco isolados e seis concentrações de inóculo) e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma nervura central contendo dois pontos de inoculação.

Efeito do início da umidade elevada na severidade da podridão mole

As nervuras foram inoculadas com as suspensões bacterianas ajustadas para 10^9 UFC mL⁻¹, conforme descrito no ensaio anterior, e após as inoculações. Em cada um desses tratamentos, a câmara úmida foi mantida por: 0, 6, 12, 24 e 48 h. O tratamento teve início colocando-se a câmara úmida após cada tempo estipulado e o tempo 48 h equivale a ausência de câmara úmida. A incubação foi realizada em B.O.D à temperatura de 30 °C. e as avaliações foram realizadas conforme descrito anteriormente. O delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5x5 (cinco isolados e cinco etapas de início de molhamento), com quatro repetições, sendo cada repetição e constituída por uma nervura central contendo dois pontos de inoculação.

Efeito da duração da umidade elevada na severidade da podridão mole

As nervuras foram inoculadas com as suspensões bacterianas (10^9 UFC mL⁻¹), conforme descrito no ensaio anterior, e após isso foram submetidas à tratamento com câmara úmida imediatamente após as inoculações e mantidas durante 0, 6, 12, 24 e 48 h. Os tratamentos foram obtidos por meio da retirada da câmara úmida após cada tempo estipulado. Nervuras tratadas com ADE constituíram o controle negativo. A incubação foi realizada em B.O.D à temperatura de 30 °C e as avaliações foram realizadas conforme descrito anteriormente. O delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5x5 (cinco isolados e cinco períodos de molhamento) com quatro repetições, onde cada repetição é constituída por uma nervura central contendo dois pontos de inoculação.

Análises dos dados

Todos os experimentos foram repetidos duas vezes. Os pressupostos da análise de variância (ANOVA) foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene ($P > 0,05$). Os dados foram comparados pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$), e para analisar os experimentos que não atingiram a homogeneidade de variância foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, EUA). Para a determinação da temperatura ótima *in vitro* os dados obtidos foram submetidos a análises de regressão linear e não-linear, sendo realizada a derivada de primeira ordem da equação de regressão com o melhor ajuste. Os gráficos foram realizados através do programa Tablecurve™ 2D 5.01

Resultados

Temperatura ideal de crescimento *in vitro* dos isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Foi observado um crescimento bacteriano na faixa de 10 a 40 °C (Fig. 1), com temperatura ideal de crescimento variando de 23 a 29 °C entre os isolados testados. A temperatura média ótima de crescimento *in vitro* foi de 24,7 °C.

Efeito da temperatura na severidade podridão mole

Na faixa de 15 a 40 °C foram observados sintomas de podridão mole nas nervuras centrais de folhas de couve-chinesa para todos os isolados, mas a temperatura de 30 °C (Fig.2), foi a que proporcionou maiores valores de SF da doença. Não houve interação significativa entre os fatores temperatura x isolados ($P \geq 0,05$), portanto, os fatores separadamente explicam a SF da doença. Os maiores valores de severidade foram observados para os isolados CCRMPCB18 e CCMPCB342, enquanto os menores valores foram observados para os CCRMPCB66 e CCRMPCB313 (Tabela 2).

Houve interação significativa entre os fatores ($P \leq 0,05$) temperaturas e isolados na severidade da podridão mole. Os isolados CCRMPCB18, CCRMPCB342 e CCRMPCB642, aumentaram significativamente a AACPD, para as três temperaturas avaliadas. Na temperatura de 30° C foram obtidos os maiores valores de AACPD, para todos isolados testados (Tabela 3).

Efeito da concentração de inóculo na severidade da podridão mole

Os cinco isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foram capazes de causar sintoma da doença a partir da concentração de 10^5 UFC mL⁻¹ exceto para os isolados CCRMPCB66 e CCRMPCB313, que só causaram doença quando inoculados na concentração 10^7 UFC mL⁻¹. Na concentração mais elevada todos os isolados apresentaram maior agressividade (Fig. 3).

Houve influência significativa entre os fatores analisados. A concentração 10^9 UFC mL⁻¹ proporcionou maior intensidade dos sintomas, para SF e AACPD, para todos os isolados testados, e a concentração 10^7 e 10^8 UFC mL⁻¹ não diferiram significativamente entre si ($P > 0,05$) (Tabela 4). Na concentração 10^9 UFC mL⁻¹, observou-se as maiores médias de SF, com destaque para o isolado CCRMPCB313 que foi o mais agressivo.

Efeito do início da umidade elevada sobre a podridão mole

Todos os isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* testados proporcionaram maior SF da doença quando submetidos à câmara úmida imediatamente após as inoculações (Fig. 4). A severidade dos isolados foi reduzida com o aumento do intervalo de tempo para início da câmara úmida, não tendo sido observado doença para todos os isolados quando as nervuras de couve-chinesa não foram submetidas a câmara úmida (tempo 48 h).

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) na interação dos fatores analisados, mas a diferença foi significativa entre os períodos de início de câmara úmida (Tabela 5). A câmara úmida logo após a inoculação (tempo 0) proporcionou maiores valores de SF da doença e de AACPD. Com 12 h de início de câmara úmida foram observados os menores valores de SF. Para a AACPD os períodos de 6 e 12 h após a inoculação de câmara úmida não diferiram estatisticamente entre si ($P>0,05$). Não houve diferença significativa entre os isolados para a SF e AACPD.

Efeito da duração da umidade elevada sobre a podridão mole

As nervuras de couve-chinesa desenvolveram sintomas da doença a partir de 6 h de duração de umidade elevada (Fig. 5), exceto para o isolado CCRMPCB66, o qual só começou a incitar o surgimento da doença com 12 h de câmara úmida. Houve interação significativa ($P\leq 0,05$) entre os isolados e a duração de câmara úmida para SF e AACPD (Tabela 6). Os períodos de umidade de 24 e 48 h de duração de câmara úmida proporcionaram maiores valores de SF da doença e AACPD, e os isolados CCRMPCB18 e CCRMPCB313, foram os mais agressivos.

Discussão

A podridão mole ocasionada por *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* é uma doença amplamente distribuída em todas regiões produtoras de hortaliças do Nordeste do Brasil (Queiroz

et al. 2017). Essa espécie foi recentemente relatada no Agreste Pernambucano causando podridão mole em couve-chinesa, sendo considerada a de maior ocorrência e prevalência e possuindo uma elevada variabilidade genética. Contudo, tendo em vista que os estudos sobre o comportamento epidemiológico desse patógeno ainda são inexistentes, o presente estudo foi desenvolvido para investigar como a temperatura e a umidade interferem no desenvolvimento da podridão mole da couve-chinesa.

A condição ideal de temperatura *in vitro* é um fator necessário para que uma bactéria possa atingir o máximo de crescimento (Nascimento et al. 2005). Diante disso, antes da realização dos experimentos conduzidos para analisar o comportamento epidemiológico da podridão mole causada por isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, foi calculada a temperatura média ótima de crescimento *in vitro* dos isolados, que foi de 24,7 °C. Essa temperatura foi utilizada para o cultivo da bactéria e preparo das suspensões em todos os experimentos. Além disso, a temperatura ideal de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ficou da temperatura ideal encontrada para *P. aroidearum*, que foi de 24,5 °C (Rezende, 2017) e para *P. atrosepticum* (26° C), embora existam espécies do gênero *Pectobacterium* que possuem uma temperatura ideal em faixas mais elevadas, como *P. wasabie* (30 °C) e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (31°C) (Du Raan et al. 2016). A temperatura ideal de crescimento variou de 23 a 29 °C entre os isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. É provável que essa diferença entre os isolados esteja relacionada a variabilidade existente dentro de espécies do gênero *Pectobacterium* (Moraes, 2018), e da origem isolados foi mais adaptado a temperaturas mais elevadas, e os isolados do Agreste, são mais adaptados a temperaturas mais baixas, na faixa de 30 °C.

A temperatura também é um fator de extrema importância no desenvolvimento do processo infeccioso (Rosa et al. 2010), e em nosso ensaio a temperatura de 30 °C foi a que proporcionou maior severidade da podridão mole em couve-chinesa. Os achados de Farrar et al. (2000) e Bhat et al. (2010) também revelaram que uma faixa de temperatura de 30-37 °C melhorou a capacidade de

desenvolvimento de podridão mole ocasionada por *Dickeya dadantii* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, respectivamente, em diferentes espécies vegetais. A temperatura afeta a densidade e dinâmica de populações de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* durante a patogênese (Moh et al. 2012). No entanto, temperaturas em torno de 30 °C estão diretamente associadas a maior severidade da podridão mole (Oliveira et al. 2014). Nas temperaturas de 15 e 40 °C, não houve desenvolvimento significativo da doença. Temperaturas extremas causam uma redução do metabolismo da fitobactéria, visto que temperaturas elevadas modificam a taxa de crescimento e a atividade metabólica de patógenos e sua capacidade de causar doença (Hugouviuex- Cotte- Pattat al. 1996). Além disso, temperaturas altas também resultam em morte celular devido à desnaturação de proteínas, o que foi constatado em trabalhos realizados por Smadja et al. (2014), em que como aumento da temperatura, a atividade da enzima pectato liase foi reduzida acentuadamente. Além disso, altas temperaturas também resultam em morte celular devido a desnaturação de proteínas, colapso das membranas citoplasmática e lise térmica (Madigan et al.2006).

A SF da podridão mole e a AACPD aumentaram com o incremento da concentração de inóculo de 10^4 para 10^9 UFC mL⁻¹, para todos os isolados testados. As concentrações mais elevadas (10^7 a 10^9 UFC mL⁻¹) proporcionaram maiores severidade da doença, enquanto, em baixas concentrações (10^4 a 10^6 UFC mL⁻¹) a quantidade de inóculo não foi suficiente para proporcionar o desenvolvimento da doença. Isso pode ser justificado pelo fato de que para ocorrer o processo da infecção é necessário que exista uma quantidade mínima de inóculo viável, justificando a necessidade de manter a quantidade de inóculo em nível baixo no campo para minimizar os riscos de surgimento de epidemia (Oliveira et al. 2014), visto que a quantidade de inóculo é um fator primordial, para ocorrência de doenças (Sussel et al. 2011). Como já era esperado, quanto maior foi a concentração do inóculo, maior foi a severidade da podridão mole, confirmando com os achados de Silveira et al. (2004), verificaram que a taxa de progresso da doença aumentou significativamente com o incremento da concentração do inóculo de *Acidovorax citrulli*, e o mesmo comportamento

foi verificado por Silva (2016) em relação a severidade da podridão em escamas, ocasionada por bactéria do complexo *Burkholderia cepacia*.

Não foi verificado sintomas da doença quando as nervuras inoculadas foram expostas a câmara úmida no período de 24 e 48 h após a inoculação, indicando a necessidade da bactéria de umidade livre para iniciar o processo infeccioso e o desenvolvimento da doença (Pringle et al. 1991). Silveira et al. (2004), encontraram resultados semelhantes quando foi inoculada a bactéria *A. citrulli* em melão amarelo, relatando que a alta umidade é uma das condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (Moh et al. 2012). Além do mais, a alta umidade estimula o processo de infecção aumentando a suscetibilidade do hospedeiro, influenciando na taxa de progresso da doença e refletindo na maior severidade.

Em nossos estudos, ficou claro que a duração da umidade, exerce uma elevada influência na epidemiologia da podridão mole, demonstrando que quanto maior o tempo de exposição das nervuras a câmara úmida maior foi a severidade da doença, representada pelo tamanho das lesões. Embora o elevado teor de umidade relativa ajude a manter a turgidez e reduzir as perdas de água na nervura, ela também pode ser favorável ao desenvolvimento de doenças (Chitarra e Chitarra 2005).

Esse trabalho é o primeiro estudo da caracterização epidemiológica da podridão mole causada por *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* em couve-chinesa. As condições que predisuseram a ocorrência de severidade da doença foram elevadas concentração de inóculo (10^9 UFC/mL), em conjunto com temperatura de 30 °C e umidade relativa elevada, próxima a 100%, durante 48 h. O conhecimento aqui obtido auxiliará o entendimento de epidemias da podridão mole e o desenvolvimento de estratégias eficientes para o manejo da doença nesse patossistema.

REFERÊNCIAS

Barroso, K. A., Moraes, A. J. G., Mariano, R. L. R., Gama, M. A. S, Souza, E.B., Queiroz, M.F., Silva, G. S. P., Da Paz, C. D., Peixoto, A.R. (2019). First Report of *Pectobacterium aroidearum* causing soft rot in lettuce and chinese cabbage in Brazil. *Plant disease, e-xtra*.

Bhat, K. A., Masoodi, S. D., Bhat, N. A., Ahmad, M., Zargar, M. Y., Mir, S. A. & Bhat, M. A. (2010). Studies on the effect of temperature on the development of soft rot of cabbage. *Journal of Phytology*, 2 (2), 64-67.

Burton, W. G., Wigginton, M. J. (1970). The effect of a film water upon the oxygen status of a potato tuber. *Potato Research*, 13, 180-186.

Cardoso, A. I. I., Piedade, M. B. S., Rodrigues, J. M & Ricardo, L. E. (2017). Produção de couve chinesa em função da fertirrigação nitrogenada e potássica nas mudas. *Horticultura Brasileira*, 35 (4), 512-518.

CENTRAL DE ABASTECIMENTO DE PERNAMBUCO. Comercialização de produtos. Recife: Central de abastecimento de Pernambuco (2019). <http://www.ceasape.org.br/calend.php>.

Chitarra, M. I. F & Chitarra, A. B (2005). *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. Lavras: UFLA.

Czajkowski, R., Kaczynska, N., Jafrab, S., Narajczyk, M., Lojkowska, E. (2017). Temperature-responsive genetic loci in pectinolytic plant pathogenic *Dickeya solani*. *Plant Pathology*, Doi: 10.1111/ppa.12618

De boer, S. H., Verdonck, L., Vrugink, H., Harju, P., Bangs, H. O., De ley, J. (1987). Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and heir taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 487-495.

Du Raan, S., Coutinho, T. A., & Van der Wall, J. E. (2016). Cardinal temperature differences, determined *in vitro*, between closely related species and subspecies of pectinolytic bacteria responsible for blackleg and soft rot on potatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 144 (2), 361-369.

Felix, K. C. S., Silva, C. L., Oliveira, W. J., Mariano, R. L. R. & Souza, E. B. (2017). Calcium-mediated reduction of soft rot disease in Chinese cabbage. *European Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0980-0>

Farrar, J. J., Nunez, J. J., & Davis, R. M. (2000). Influence of soil saturation and temperature on *Erwinia chrysanthemi* soft rot of carrot. *Plant Disease*, 84 (6), 665-668.

Goodman, R. N., Kiral, Y, Z. & WOOD, K.R. (1986). *The biochemistry and physiology of plant disease*. Columbia. University of Missouri Press.

Golkhandan, E., Sijam, K., Meon, S., Ahmad, Z. A. M., Nasehi, A & Nazerian, E. (2013). First Report of *Pectobacterium wasabiae* Causing Soft Rot of Cabbage in Malaysia, *Plant disease*, 97(8) 1110,2-1110,2.

Goto, M. (1992) *Fundamentals of bacterial plant pathology* Academic Press, San Diego.

Guo, M., Liu, Y., Liu, S.N., Qu, Q.Z, Cui, T.F & Zhang, Y.W (2020). First Report of Bacterial Soft Rot Caused by *Pantoea agglomerans* on Chinese Cabbage in China, *Plant disease*, 104(1), 227-227.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., & Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology*, <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.213>

Queiroz, M. F., Albuquerque, G. M. R., Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Moraes, A.G., Souza, E. B., da Paz, C. D. & Peixoto, A. R. (2017). First report of soft rot in kale caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in Brazil. *Plant disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0266-PDN>

Lopes, C. A., Durval, A. M. Q. (2007) *Doenças bacterianas*. In: Lopes, C. A.; Avila, A.C. (Org.). *Doenças do tomateiro*. 2. ed. (pp.53-57) Brasília: Embrapa Hortaliças

Madigan, M.T & Martinko, J. M. (2006). *Brock Biology of Microorganimo*. 11th Ed. London; Preson Prentice Hall.

Matos, L. M., Tavares, S. A. (Ed.). (2010). *Hortaliças: como comprar, conservar e consumir*. 2. ed. rev. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 209.

Moh, A. A., Massart, S., Jijakli, M. H., & Lepoivre, P. (2012). Models to predict the combined effects of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium*

carotovorum subsp. *carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers. *Journal of Plant Pathology*, 94, 181-191.

Moraes, A. J.G. (2018). Diversidade de bactérias causadoras de podridão mole em hortaliças no estado de Pernambuco. 109f. *Tese (Doutorado em fitopatologia)*. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2018.

Nascimento, A. R.P., Mariano, R. L.R. e Gama, M. A. S (2005). Métodos de prevenção e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. *Tropical plant pathology*, <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000600014>

Oliveira, T. A. S., Blum, L. E. B., Duarte, E. A. A., Tavares, G. M., & Luz, E. D. M. N. (2014). Fatores epidemiológicos de *Phytophthora palmivora* afetando a severidade da podridão-dos-frutos do mamoeiro na pós-colheita. *Summa Phytopathologica*, 40 (3) 256-263.

Pérombelon, M. C. M. & Kelman, A. (1980). Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology*<https://doi.org/10.1146/annurev.pv.18.090180.002045>

Peruch, L. A. M, Michereff, S. J, Araújo, I. B. (2006). Levantamento da intensidade da alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina *Horticultura Brasileira*, 24(4),464-469.

Ren, J., Petzoldt, R & Dickson, M. H. (2001). Genetics and population improvement of resistance to bacterial soft rot in chinese cabbage. *Euphytica*, <https://doi.org/10.1023/A:1026541724001>

Rezende, J. S. Caracterização epidemiológica da podridão mole da couve-chinesa causada por *Pectobacterium aroidearum*, 2017. 53f. *Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)*. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Romeiro, R. S. (1995). *Bactérias fitopatogênicas*. Viçosa: Imprensa Universitária, UFV.

Rosa, D. D., Basseto, M. A., & Furtado, E. L. (2010). Effect of temperature on *Plasmodiophora brassicae* infection. *Summa Phytopathologica*, 36 (3), 240-243.

Shaner, R. G., Finney, R. E. (1997). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*. 67, 1051-1056.

- Smadja, B., Latour, X., Trigui, S., Burini, J. F., Chevalier, S & Orange, N. (2004). Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). *Canadian Journal of Microbiology*, DOI: 10.1139 / w03-099

Seo, S. T., Koo, J. H., Hur, J. H., & Lim, C. K. (2004). Characterization of Korean *Erwinia carotovora* strains from potato and chinese cabbage. *The Plant Pathology Journal*, 20 (4), 283-288.

Silva, A. M. F., Mariano, R. L. R., Michereff, S. J., Silveira, E. B. & Medeiros, F. H. V. (2007). Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface e couve-chinesa em Pernambuco. *Revista Caatinga*, 20(2), 84-93.

Silva, W. A. *Caracterização epidemiológica da podridão em escama da cebola*. 2016. 50f. *Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)*. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Sussel, A. A. B., Pozza, E. A., Castro, H.A. & Lasmar, E. B. C (2011). Incidência e severidade do mofo-cinza-da-mamoneira sob diferentes temperaturas, períodos de molhamento e concentração de conídios. *Summa Phytopatologica*, 37(1), 30-34.

Silveira, E. B., Mariano, R. L. R., & Michereff, S. J. (2004). Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. *Fitopatologia Brasileira*, DOI: 10.1590/S0100-41582004000100006

Tokeshi, H.; Carvalho, P. C. T. (1980) Doenças do tomateiro - *Lycopersicon esculentum* Mill. In: GALLI, F. (Coord.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. (pp.236-250). São Paulo: Agronômica Ceres.

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

Tabela 1. Relação dos isolados *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causadores de podridão mole utilizados no estudo.

ISOLADO	LOCAL DE COLETA	MESORREGIÃO	HOSPEDEIRO	BLAT	
				16S rDNA %	BLAST MDH
CCRMPCB18	Camocim de São Félix	Agreste	Couve Chinesa	100-Pcb	99-Pcb
CCRMPCB66	Vitória de Santo Antão	Mata	Alface	100-Pcb	99-Pcb
CCRMPCB313	Garanhuns	Agreste	Alface	99-Pcb	
CCRMPCB362	Garanhuns	Agreste	Alface	100-Pcb	
CCRMPCB642	Petrolina	Sertão	Couve	99-Pcb	

Tabela 2. Efeito de diferentes temperaturas na severidade final (SF) da podridão mole em nervuras destacadas de couve-chinesa inoculadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Isolados	SF
CCRMPCB18	27,4 ab
CCRMPCB66	14,2 c
CCRMPCB313	11,5 c
CCRMPCB342	31,8 a
CCRMPCB642	21,33 b
CV (%)	0,6755

Temperatura	SF
25°C	19,3 b
30°C	28,8 a
35°C	15,6 b
CV (%)	0,5233

*Média de oito repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de LSD (P=0,05).

Tabela 3. Efeito de diferentes temperaturas na área abaixo da curva de progresso da podridão mole em nervuras destacadas de couve-chinesa inoculadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

ISOLADOS	TEMPERATURA		
	25 °C	30 °C	35 °C
CCRMPCB18	60,07 abB	100,1 aA	48,97abB
CCRMPCB66	29,54 cA	50,1 bcA	41,05bcA
CCRMPCB313	35,9 bcA	32,65 cA	18,31 cAa
CCRMPCB342	73,12 aB	98,59 aA	48,04 abC
CCRMPCB642	48,3 bcA	70,69 bA	70,12 aA

*Média de oito repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de LSD (P=0,05).

Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de inóculo de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasilensis* na severidade final e na área abaixo da curva de progresso da podridão mole (AACPD) da podridão mole em nervuras destacadas de couve-chinesa.

Isolados	Severidade Final			AACPD		
	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
CCRMPCB18	12,97aB	13,57abB	19,83bcA	35,41aB	41,16abAB	52,58 bA
CCRMPCB66	9,06aB	9,32aAB	15,41Ca	27,30 aB	28,42 bB	48,64 bA
CCRMPCB313	12,34aB	17,94abB	41,64Aa	36,20 aB	42,32 aB	86,73 aA
CCRMPCB362	10,83aB	11,32Bb	22,42Ba	30,71 aB	36,2 abB	49,53 bA
CCRMPCB642	9,20aBb	12,32abAB	15,76cA	26,81 aB	37,65abAB	45,31 bA

CV(%)	40,45	41,66
--------------	-------	-------

*Média de oito repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de LSD (P=0,05).

Tabela 5. Efeito do início da umidade na severidade final –SF (diâmetro da lesão) e área abaixo da curva de progresso da podridão mole (AACPD) em nervuras destacadas de couve-chinesa inoculadas com os isolados CRMPCB18, CRMPCB66, CRMPCB313, CRMPCB342 e CRMPCB642 de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

Início de Câmara úmida*	SF	AACPD
0	86,875 a	88,088 a
12	57,050 b	54,075 b
24	37,575 c	39,338 b

*Média de oito repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não difere estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P < 0,05).

Tabela 6. Efeito da duração da umidade na severidade final (diâmetro da lesão) e área abaixo da curva de progresso da podridão mole (AACPD) em nervuras destacadas de couve-chinesa inoculadas com os isolados CRMPCB18, CRMPCB66, CRMPCB313, CRMPCB342 e CRMPCB642 de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Isolados	Severidade Final			AACPD		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
CCRMPCB18	15,30 bB	51,70 aA	53,10 bA	31,89 bB	107,67 aA	111,30 aA
CCRMPCB66	11,68 bB	17,92 cA	18,82 cA	29,76 bB	43,63 cA	44,91 bA
CCRMPCB313	37,86 aC	44,55 bB	60,65 aA	79,17 aB	86,46 bB	119,7 aA
CCRMPCB362	15,60 bB	19,56 cAB	23,43 cA	33,02 bB	40,41 cAB	49,28 bA
CCRMPCB642	11,43 bB	19,73 cA	21,37 cA	26,10 bB	46,65 cA	44,92 bA
CV (%)		19,45			18,66	

*Média de oito repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de LSD (P=0,05).

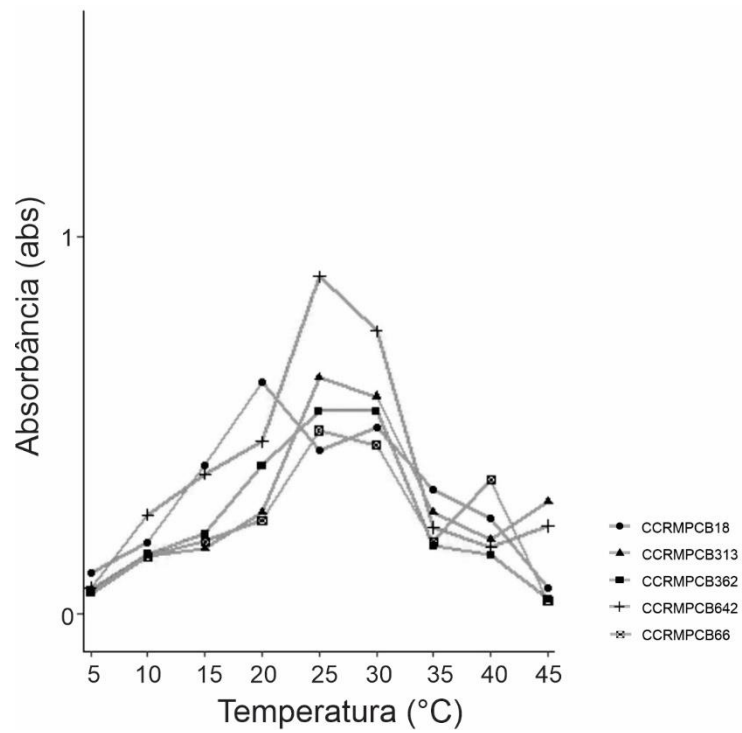


Fig. 1 Curva de performance térmica *in vitro* de cinco isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, em meio de cultura líquido (NYD).

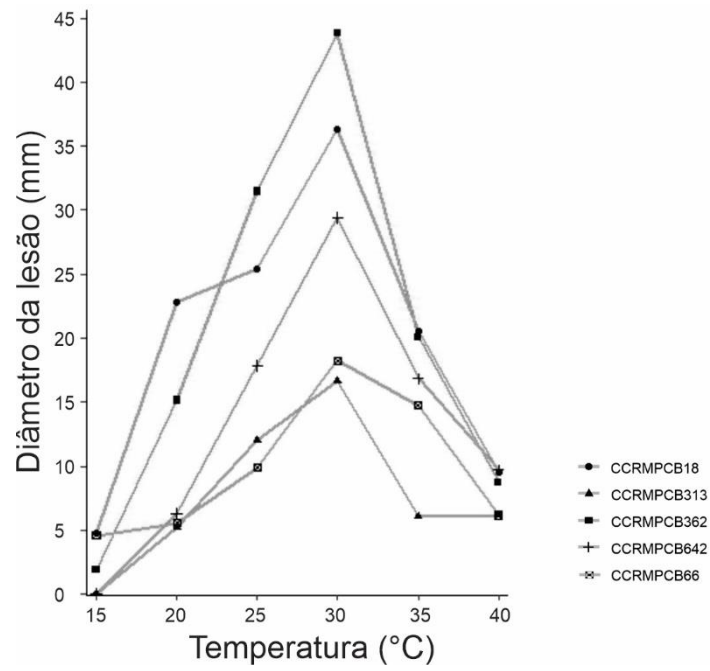


Fig. 2 Efeito da temperatura na severidade final (diâmetro da lesão) da podridão mole em nervuras destacadas de couve-chinesa inoculadas com diferentes isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

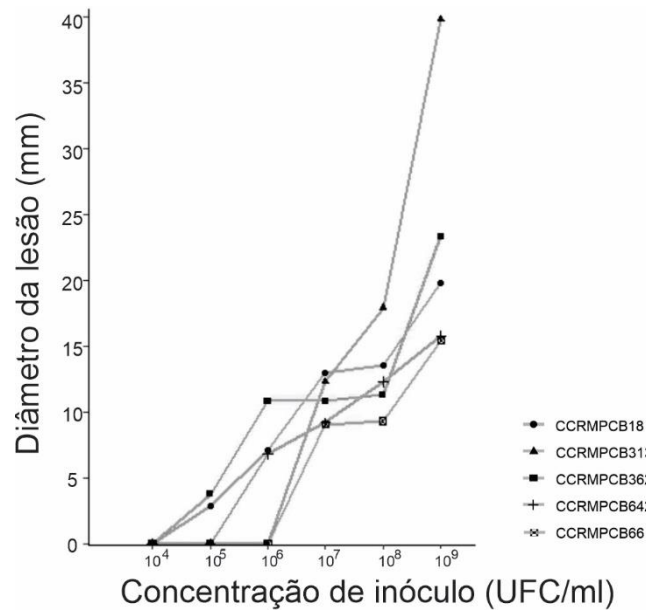


Fig. 3 Efeito da concentração de inóculo UFC mL⁻¹ na severidade final (diâmetro da lesão) da podridão mole em nervuras destacadas de couve-chinesa inoculadas com diferentes isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

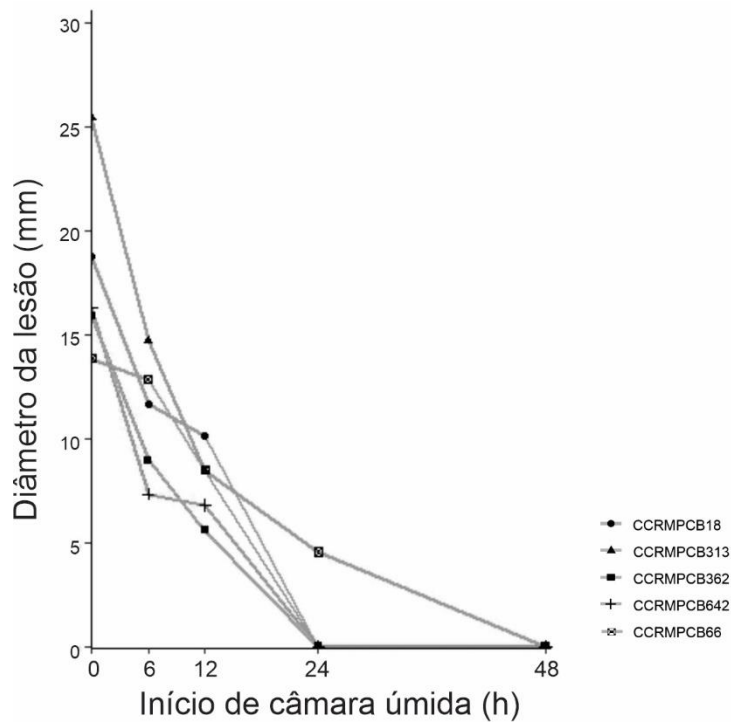


Fig. 4 Efeito do início da umidade elevada na severidade final (diâmetro da lesão) da podridão mole em nervuras destacadas de couve-chinesa inoculadas com diferentes isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*.

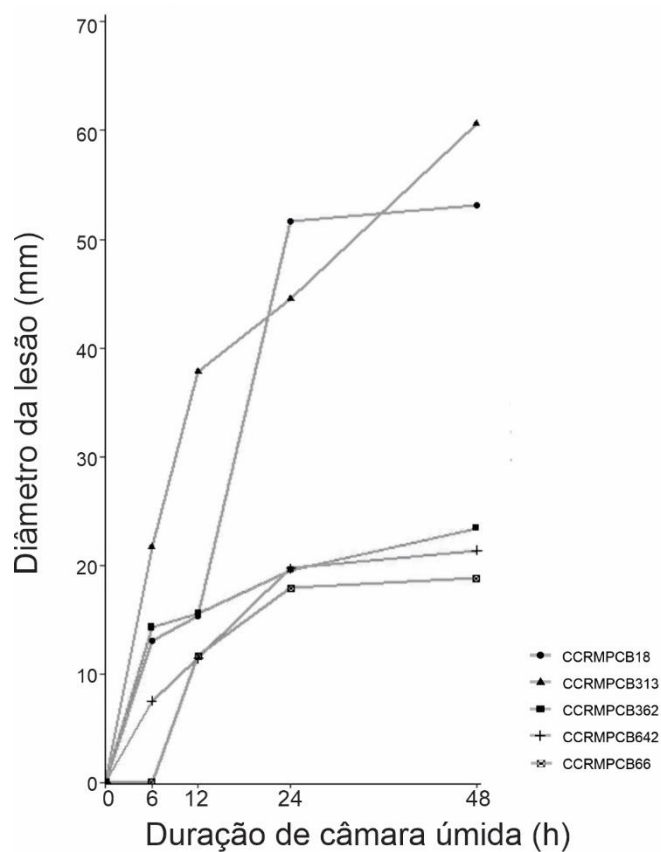


Fig. 5 Efeito da duração da umidade elevada na severidade final (diâmetro da lesão) da podridão mole em nervuras destacadas de couve-chinesa inoculadas com diferentes isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

CAPÍTULO III

Efeito de óleos essenciais vegetais no crescimento e em determinantes da patogenicidade de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* e no controle da podridão mole em couve-chinesa

Efeito de óleos essenciais vegetais no crescimento e em determinantes da patogenicidade de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* e no controle da podridão mole em couve-chinesa

CRUZ, B. L. S¹.; CONCEIÇÃO, C. S.¹.; ALBUQUERQUE, G. M. R.¹.; SANTOS, L. N.¹.; SOUZA, E. B.².; GAMA, M. A. S.¹.

¹Departamento de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, CEP52.171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Biologia, Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor para correspondência: marco.gama@ufrpe.br

RESUMO

A couve-chinesa é uma hortaliça intensamente cultivada nas regiões da Zona da Mata e do Agreste Pernambucano, tendo sua produção limitada entre outros fatores pela ocorrência da podridão mole. Diante disso, objetivou-se verificar a atividade antimicrobiana de sete óleos essenciais: alecrim, bergamota, capim limão, citronela, cravo, eucalipto e laranja doce, frente à isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*) em condições *in vitro* e *in vivo*. Foi observado o efeito das concentrações sub-MCIs dos óleos essenciais em diferentes fatores determinantes da patogenicidade, incluindo motilidade, formação de biofilme e crescimento planctônico, e das CBM no controle da podridão mole em couve-chinesa em casa de vegetação. Todos óleos essenciais testados apresentaram atividade antimicrobiana e interromperam o desenvolvimento normal da formação do biofilme, sendo os óleos essenciais de eucalipto e cravo os mais eficazes na prevenção da formação de biofilme. Houve uma redução significativa na

motilidade dos isolados CCRMPCB66 e CCRMPCB313 com as doses sub-MCIs dos óleos essenciais de alecrim e eucalipto, respectivamente. Porém, houve um aumento na motilidade para os isolados CCRMPCB18 com a exposição a doses sub-MCIs dos óleos de bergamota, capim limão, citronela e cravo, no isolado CCRMPCB642 com bergamota e laranja doce. Os óleos essenciais testados não alteraram a cinética de crescimento dos isolados. Quando foi utilizado a dose CMB de cada óleo essencial nos componentes epidemiológicos da podridão mole, os óleos de cravo, citronela, laranja doce, capim limão e eucalipto promoveram uma redução na severidade final da doença e na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A análise por GC-MS revelou diferentes constituintes ativos nos óleos essenciais, destacando-se como os principais canfora, limoneno, eugenol e mirceno, respectivamente, nos óleos essenciais de alecrim, citronela, cravo e capim limão. Os óleos essenciais estudados podem ser considerados agentes antibacterianos promissores para o controle da podridão mole em couve-chinesa, indicando que atividade de compostos antimicrobianos à base de plantas é uma solução prática que pode ser incorporada a estratégia de manejo da doença.

Palavras-chaves: agentes antibacterianos *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*; controle alternativo; composição química;

INTRODUÇÃO

A couve chinesa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) é uma hortaliça muito cultivada pelo seu valor nutricional. No entanto, apesar da adaptação da couve-chinesa, a produção e processo de armazenamento pode ser afetada por uma grande variedade de pragas e doenças (Silva et al. 2014). As doenças de ordem bacterianas estão entre os principais fatores limitantes a seu rendimento, dentre elas, a podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Duarte et al. 2014) é considerada a mais destrutiva e importante doença da couve-chinesa.

Os sintomas da podridão mole em couve-chinesa se iniciam na base e nervura das folhas, observando-se a maceração destes tecidos, que ficam em contato com o solo infestado, progredindo rapidamente para o caule, resultando no colapso da planta. Esses patógenos são conhecidos como agentes maceradores de tecidos, devido a produção de enzimas degradadoras de parede celular primária das células vegetais (PCWDEs) estando classificadas em poligalacturonase (PG), pectina liase (PL) e pectinesterase (PE) de acordo com a forma de ação (Dartora et al., 2002). Destacam-se as pectato liase (Pel) poligalacturonase (Peh), protease (Prt) e celulase (Cel), produzidas via sistema de secreção do tipo II (SST2). Além do mais, essas bactérias possuem uma ampla gama de hospedeiros (Czajkowski et al. 2015; Davidsson et al. 2013; Mansfield et al. 2012), dentre eles, a couve-chinesa é um dos mais importante (Oskiera et al. 2017).

A podridão mole é favorecida sob condições de temperatura de 31 a 32 °C (Du Rann el.2006), o que permite ao patógeno permanecer virulento em diferentes climas. O controle da podridão mole é difícil, visto que a *P. carotovrum* subsp. *brasiliensis* tem uma ampla gama de espécies hospedeiras e capacidade de sobrevivência em restos de cultura no solo. O controle químico tem sido considerado insatisfatório e/ou antieconômico (Vanjildodj et al., 2009) e, também, não há antibióticos registrados para esse patossistema (AGROFIT, 2020). Com a conscientização acerca dos problemas ambientais advindos do uso indiscriminado de agroquímicos, uma alternativa a ser incorporada no manejo integrado da podridão mole é o uso de compostos derivados de material vegetal. Dentre estas substâncias, estão os óleos essenciais, que vem abrindo um caminho promissor no controle de fitobacterioses (Mari et al. 2016). Os óleos essenciais são considerados de baixo custo e são efetivos em baixas dosagens, não sendo considerados prejudiciais aos homens e animais (Ghalem et al. 2016). Essas substâncias possuem características antimicrobianas devido a compostos bioativos resultantes do metabolismo secundário das plantas, incluindo os alcaloides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, lipídeos, fenólicos, terpenos, poliacetilenos, polifenóis.

Adicionalmente, alguns desses compostos são capazes de influenciar mecanismos de virulência de fitobactérias (Borges et al. 2018).

Até o momento, não se tem conhecimento da influência de óleos essenciais sobre os fatores de virulência de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* em couve chinesa. No entanto, os efeitos de óleos vegetais sobre o controle de doenças, já foi relatado em diversos patossistemas (Costa et al. 2008; Jeong et al. 2009; Hajian-Maleki et al. 2019; El-Haback et al. 2019). Diante do exposto, esse trabalho tem como objetivos determinar as propriedades antibacterianas dos óleos essenciais de alecrim, bergamota, capim limão, copaíba, cravo, eucalipto e laranja doce, bem como o crescimento bacteriano *in vitro* e nos fatores ligados à virulência, como motilidade, efeito na formação do biofilme e antibiofilme, e a influência desses fitoquímicos no controle da podridão mole em couve-chinesa em condições de casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Óleos essenciais utilizados

Os óleos essenciais naturais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), bergamota (*Citrus aurantium* var. *bergamia* L.), capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapp), citronela (*Cymbopogon nardus* L.), cravo (*Dianthus caryophyllus*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) e laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) (Industria Bioessência Produtos Naturais LTDA., São Paulo, Brasil) foram utilizados nos experimentos. Esses óleos foram selecionados com base em estudos anteriores realizados para avaliar a influência dos óleos essenciais sobre diferentes fitobacterioses (Amorim et al. 2011; Guerra et al. 2014).

Isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Em todos os experimentos foram utilizados isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasilensis* (CCRMPCB18, CCRMPCB66, CCRMPCB175, CCRMPCB313, CCRMPCB362 e CCRMPCB642) pertencentes à Coleção de Cultura Rosa Mariano (CCRM), do departamento de Agronomia/ Área de fitoassanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil. Esses isolados foram obtidos de plantas de alface e couve-chinesa com sintomas de podridão mole em plantios nas mesorregiões do Agreste e do Sertão de Pernambuco, Brasil, e foram identificados por meio de análises moleculares com genes 16S rDNA, e análise de sequências multilocus com os genes gap A, icdA, mdh, proA, gyrA, ropS, recA, dnaX, fusA e rplB (Morais, 2018).

Para utilização nos experimentos, os isolados foram cultivados em meio CPG (caseína hidrolisada 1 g L⁻¹, peptona 10 g L⁻¹, dextrose 10 g L⁻¹, ágar 18 g L⁻¹) pelo método de estrias (Mariano e Silveira, 2015) por 48 h temperatura de 28°C. Após este período, água destilada esterilizada (ADE) foi adicionada placa de Petri contendo o crescimento bacteriano e a concentração da suspensão foi ajustada em fotocolorímetro (Analyser[®]) a 570 nm de absorvância (A_{570nm}), de acordo com equação pré-estabelecida, onde $A_{570} = 0,36$ equivale a $1,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹.

Análise da atividade antibacteriana dos óleos essenciais

O experimento foi realizado usando o método CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) (CLSI, 2009). A bactéria foi cultivada em meio NYDA (10 g L⁻¹ de dextrose; 5 g L⁻¹ de extrato de levedura; 3 g L⁻¹ de extrato de carne; 5g L⁻¹ de peptona; 20 g L⁻¹ de ágar), por 48 h a 30 °C. As diluições foram preparadas em placas de microtitulação de 96 poços, contendo 100 µL do meio líquido NYD (NYDA sem ágar), para obtenção de concentrações finais variando de 0,39 a 100 mg mL⁻¹ e Tween 80 a 1%(v/v). Finalmente, 20 µL da suspensão bacteriana da suspensão dos isolados foram depositados nas microplacas. As placas foram mantidas em estufa do tipo B.O.D

a 30°C, por 24 horas. Para o controle da sensibilidade do fitopatógeno foi adicionado um tratamento com o antibiótico de amplo espectro casugamicina (3 mL L⁻¹). A coluna 1 da placa de Elisa, correspondeu ao meio puro, e a última coluna continha o meio de cultura acrescido de Tween 80 a 1%(v/v), para verificar o efeito do eluente sobre a bactéria. A menor concentração de extrato na qual não foi visível o crescimento da bactéria foi definido como CMI. As placas foram coradas com resazurina sódica (0,005 mg em 50 mL de ADE), depositando-se 20 µL em cada poço; em seguida cobertas com papel alumínio e mantidas no escuro. Após 30 minutos, avaliou-se o resultado deste teste colorimétrico, sendo a cor azul para bactérias mortas ou poço sem bactérias, e a cor rosa para bactérias vivas. A CMB foi determinada antes dos poços serem corados com a resazurina, da seguinte maneira: de cada poço foi coletado 10 µL da suspensão, e depositados em placas de Petri com meio NYDA e incubado a 30 °C por 24 h. A completa ausência de crescimento na superfície do meio na menor concentração da amostra foi definida como o CMB. Os testes foram realizados em triplicatas. A razão entre os valores da CMB e CMI foi utilizada para distinguir se as substâncias presentes no óleo possuíam ação bactericida (≤ 4) ou bacteriostática (≥ 4) (Biyiti et al. 2004).

Os valores sub-CMIs selecionados para cada óleo e para cada isolado foram utilizados para examinar os efeitos dos óleos sobre a virulência dos isolados, pois não comprometem a viabilidade da célula bacteriana.

Análise nos fatores de patogenicidade de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Crescimento Planctônico

Para avaliar a ação antibacteriana dos óleos essenciais sob o crescimento planctônico, foram utilizadas microplacas de microdiluição de poliestireno transparente de 96 poços (Kasvi, Brasil), preenchidas como descrito anteriormente, contendo 20 µl da suspensão bacteriana e 20 µl das doses sub-CMI dos óleos essenciais. O crescimento planctônico foi avaliado pela diferença entre a

absorbância (A_{570}), medida no início (0 h) e término do experimento (24 h), mensurada em leitor de placa de Elisa (Synergy H1 Microplate Reader, Biotek, USA). Valores acima de 100% representam um estímulo no crescimento planctônico. O controle positivo correspondeu a substituição dos óleos essenciais por 20 μ l de ADE. Também foram adicionados controles negativos que possuíam apenas meio de cultura NYD, para verificar a presença de contaminantes. Os testes foram realizados em triplicatas.

Formação do biofilme

A formação de biofilme bacteriano foi avaliada em microplacas de poliestireno transparente, com 96 poços de fundo plano (Costar 3596 - Corning Inc., Amsterdam, USA), de acordo com Trentin et al. (2011), com adaptações. Em resumo, em cada poço foi adicionado 160 μ l do meio NYD, 20 μ l da suspensão bacteriana e 20 μ l das doses sub-CMI dos óleos essenciais. Após 36 h de incubação em B.O.D ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), o conteúdo das placas foi removido e os poços lavados três vezes com solução salina esterilizada (0,9%) para remoção das células planctônicas. Em seguida, as células bacterianas remanescentes foram fixadas pelo calor em estufa de secagem por 1 h a 60°C . A camada de biofilme formada foi corada adicionando-se 200 μ l de cristal violeta a 0,4% em cada poço, com posterior incubação a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as placas foram lavadas em água corrente e batidas sobre papel toalha dobrado para a remoção do excesso de corante. O biofilme foi solubilizado adicionando-se 200 μ l de etanol a 99,5% em cada poço, incubando-se a placa a temperatura ambiente por 15 min. A absorbância (A_{570}) mensurada em leitor de placa de Elisa. Os controles negativos foram constituídos por NYD, para a verificação da presença de contaminantes. O experimento foi repetido duas vezes, com quatro repetições por tratamento.

Curva de crescimento

Para a determinação da curva de crescimento bacteriano, 20 µl das doses sub-MCIs dos óleos essenciais foram adicionadas ao meio NYD, na qual foram adicionadas Tween 80 (v/v) e distribuídas em placas de 96 poços. Os isolados foram cultivados por 24 horas em meio NYD e ajustado para $1,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ e transferidos um volume de 140 µl para os poços. O meio NYD puro e acrescido com 1% de Tween 80 (v/v) foram utilizados como controles. As placas foram mantidas a em estufas do tipo B.O.D a uma temperatura de 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). As avaliações foram realizadas em intervalos de 4 h estendendo até 36 horas. O experimento foi repetido duas vezes, com quatro repetições por tratamento.

Ensaio de motilidade

Para o ensaio da motilidade 20 mL das suspensões bacterianas ($1,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹) foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 20 µl das doses sub-CMIs de cada óleo essenciais. A mistura foi agitada com auxílio de um vortex por 10 min. Dez microlitros das suspensões tratadas foram depositados no centro de placas de Petri contendo meio *swarming* (extrato de carne 3 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, dextrose 5 g L⁻¹, ágar 5 g L⁻¹), e as placas foram incubadas em estufas do tipo B.O.D a uma temperatura de 28 °C durante 36 h. Em seguida, foi realizada a mensuração do diâmetro no sentido longitudinal e transversal da colônia, com auxílio de paquímetro digital. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 7 x 6 (sete óleos essenciais e seis isolados bacterianos). Cada tratamento foi composto por quatro repetições e as culturas bacterianas dos isolados obtidas a partir das suspensões sem os tratamentos com os óleos essenciais foram utilizadas como controle. O experimento foi realizado duas vezes.

Efeito de óleos essenciais nos componentes epidemiológicos da podridão mole

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com plantas de couve-chinesa híbrido Eikoo (horticeres®), a qual é comumente cultivada nas áreas produtoras da mesorregião do

Agreste de Pernambuco. A semeadura foi realizada em bandeja de poliestireno expandido com 200 células, contendo substrato da marca comercial Basaplant®, e após 20 dias, as mudas foram transplantadas para vasos de plástico com capacidade de 500 mL, sendo mantidas a uma temperatura $\pm 35^{\circ}\text{C}$, irrigando-se diariamente conforme a necessidade.

Plantas de couve chinesa com 40 dias foram tratadas com os óleos essenciais diluídos em ADE contendo 1% de Tween 20, nas CMB de cada óleo determinadas em ensaios *in vitro* e agitados durante 10 minutos antes da pulverização com atomizador manual. A pulverização foi realizada até o completo molhamento da superfície foliar até o ponto de escorrimento, após 48 h, as plantas foram inoculadas com dois isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (CCRMPCB66 e CCRMPCB313) na base do pecíolo da segunda e terceira folhas definitivas, pelo método de picada (MARIANO e SILVEIRA, 2005). Em resumo, foi realizado um ferimento com alfinete entomológico a profundidade de 1 mm, seguindo-se a deposição de 10 μL de suspensão bacteriana ($1,0 \times 10^9$ UFC mL^{-1}) com auxílio de um micropipetador. Após as inoculações, as plantas foram submetidas à câmara úmida, constituída por sacos plásticos umedecidos, durante 48h.

As avaliações foram realizadas a intervalos de seis horas até completar 48 h, observando-se a severidade da doença, estimada com o auxílio de escala descritiva com notas variando de 1 a 9 (Ren et al. 2001), 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 os dados da severidade foi determinada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), calculada pela expressão $\text{AACPD} = [\sum (y_i + y_{i+1})/2 \cdot dt_i]/n$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas, dt_i o intervalo entre as avaliações e n é a duração do período de avaliação, e a severidade final, que correspondeu a nota da última avaliação de cada tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado,

com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma planta com dois pontos de inoculação. Os controles foram constituídos por plantas tratadas similarmente com água e com o antibiótico agrícola Kasumin[®] na concentração de 3g L⁻¹ de água, e dois isolados (CCRMPCB66 e CCRMPCB313). O experimento foi repetido duas vezes.

Análises da composição dos óleos essenciais

A determinação da composição química dos óleos essenciais de alecrim, citronela, cravo e capim limão, foi realizada por meio da técnica de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa (GC-MS) (Agilent Technologies 5975A GC e 59 57C MSD). Utilizou-se uma coluna capilar HP-5 MS (30m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) com hélio como gás de arraste. O programa de temperatura do forno teve início com 70 °C por 5 min, passando a segunda etapa com 50-250 °C (3 °C min⁻¹), e a terceira com 250 °C por 10 min, com uma temperatura do injetor (250°C), volume de injeção (1µ L), razão dividida (1:20); gás portador (hélio a 0,06 L h⁻¹), potencial de ionização (70 Ev), corrente e ionização (150 µA), temperatura da fonte de íons (280 °C), faixa de massa (35-465 amu). Os componentes individuais dos óleos essenciais foram identificados por seus respectivos espectros de massa.

Análises estatísticas

Os pressupostos da análise de variância (ANOVA) foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene (P>0,05). Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas usando o teste LDS de Fisher (P≤ 0,05), para comprar o efeito dos óleos essenciais nos componentes epidemiológicos e o teste Dunnett's (P≤ 0,05), que foi utilizado para comprar o efeito dos óleos essenciais em relação ao controle. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, EUA). Os gráficos foram realizados com auxílio do programa SigmaPlot 13 (California, USA).

RESULTADOS

Análises da atividade antibacterianas

Os sete óleos essenciais testados apresentaram atividades bactericida e ou bacteriostática para os isolados testados (Tabela 1), com exceção do isolado CCRMPCB175 que não foi sensível ao óleo essencial de laranja doce. Em baixas concentrações ($0,39 \text{ mg mL}^{-1}$), os óleos essenciais capim limão e cravo apresentaram atividades bactericida contra todos os isolados testados, enquanto o óleo essencial de laranja doce necessitou de altas concentrações ($100/50 \text{ mg mL}^{-1}$) para apresentar atividade bactericida, inclusive não inibiu o crescimento do isolado CCRMPCB175. Os demais óleos testados necessitaram de doses intermediárias frente aos isolados testados. O antibiótico não apresentou atividade antibacteriana contra os isolados. O teste de viabilidade celular, realizado por meio do teste colorimétrico com resazurina sódica, indicou que nas células as quais os óleos essenciais tiveram efeito bactericida apresentou coloração azul, e os poços na qual as células bacterianas estavam vivas, apresentaram coloração rosa a vermelha. Esse comportamento foi verificado em todos os isolados tratados com diferentes óleos essenciais (Fig.1).

Análise nos fatores de patogenicidade de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Crescimento planctônico

A formação de células planctônicas foi fortemente influenciada pela exposição dos isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* a dosagens sub-MCIs dos diferentes óleos essenciais testados (Tabela 2). O óleo essencial de laranja doce promoveu uma ausência de crescimento planctônico significativo ($P \leq 0.05$) para todos os isolados que apresentou atividade antibacteriana (Tabela 1). Para o isolado CCRMPCB175, o óleo essencial de bergamota foi o óleo essencial que proporcionou uma menor formação de células planctônicas. Em contrapartida, verificou-se que o óleo essencial

de bergamota estimulou significativamente ($P \leq 0.05$) a formação do crescimento planctônico nos isolados CCRMPCB66 e CCRMPCB642. Os óleos essenciais de alecrim, capim limão, cravo e eucalipto, promoveram a formação de células planctônicas no isolado CCRMPCB175.

Biofilme

As doses sub-MCIs dos óleos essenciais testados interromperam o desenvolvimento normal da formação de biofilme da maioria dos isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Fig. 2). O isolado CCRMPCB18 foi o mais sensível quanto a exposição a doses sub-MCIs de todos os óleos essenciais testados. Apenas para o isolado CCRMPCB362, as doses sub-MCIs dos óleos não reduziram significativamente ($P \geq 0.05$) a formação de biofilme quando comparado com o controle. Para todos os isolados, os óleos essenciais de cravo e eucalipto foram os mais eficazes na prevenção da formação de biofilme.

Motilidade *swarming*

Em nossos ensaios foi possível verificar que os efeitos das doses sub-MCIs dos óleos essenciais na motilidade foram diferentes entre os seis isolados testados (Fig. 3). O isolado CCMPBC313, obteve uma maior motilidade (tratamento controle), quando comparado aos demais isolados. Houve uma redução significativa ($P \leq 0.05$) na motilidade apenas nos isolados CCRMPCB66 e CCRMPCB313 com as doses sub-MCIs dos óleos de alecrim e eucalipto respectivamente. Porém, para o isolado CCRMPCB18 os óleos essenciais de bergamota, capim limão, citronela e cravo proporcionaram um aumento na motilidade. Para o isolado CCRMPCB66 só houve um aumento significativo ($P \leq 0.05$) na motilidade quando exposto ao óleo de alecrim, e no isolado CCRMPCB642, aos óleos de bergamota e laranja doce.

Crescimento dos isolados

Nas análises da curva de crescimento, os isolados apresentaram a mesma tendência nos padrões de crescimento, independente de terem ou não sido tratados com as doses sub-MCIs dos óleos essenciais. No entanto, quando se analisa a taxa de crescimento quanto a densidade populacional máxima, os isolados que não receberam o tratamento com as doses sub-MCIs dos óleos essenciais apresentaram uma tendência de crescimento superior (Fig. 4). A maioria dos isolados que foram tratados com o óleo essencial de citronela apresentou uma menor taxa de crescimento bacteriano frente aos demais óleos testados.

Efeito de óleos essenciais na redução da severidade da podridão mole em plantas de couve-chinesa

Não foram observados sintomas de fitotoxidez em plantas de couve-chinesa tratadas com os óleos essenciais testados. Os óleos essenciais de cravo, citronela, laranja doce, capim limão e eucalipto mostraram uma redução significativa ($p \leq 0,05$) na severidade final da doença nos dois isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* em comparação com os controles em casa de vegetação (Figura 5). Já os óleos essenciais de bergamota e alecrim foram estatisticamente iguais aos controles. Em relação a AACPD, todos os óleos essenciais testados promoveram uma redução significativa, quando comparado aos controles.

Análises da composição dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de alecrim, capim limão, citronela e cravo foram escolhidos para a análise do perfil fitoquímico em decorrência dos resultados positivos frente isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Por meio da análise de cromatografia gasosa, foi analisado o fluxo total de íons (Figura 6) e, com base no espectro de massa foi possível identificar diferentes componentes nos óleos (Tabela 3).

Discussão

No presente estudo foi observado que, em baixas concentrações, os óleos essenciais de alecrim, bergamota, capim limão, citronela, cravo, eucalipto e laranja doce testados possuem atividade bactericida contra *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, exceto para o óleo de laranja doce. Sabe-se que em doses altas (níveis mais elevados de MCIs), devido à composição complexa dos óleos essenciais, o seu modo de ação envolve diferentes mecanismos, onde todos os componentes da célula tornam-se possíveis alvos de atuação desses óleos. Porém uma das características mais marcantes dos óleos é a lipofilicidade, o que permite que os componentes dos óleos passem através da membrana citoplasmática, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios. E assim, alternando sua permeabilidade de organelas celulares, o que permite a saída de íons e do conteúdo celular, modificando o equilíbrio celular, provocando a liberação de macromoléculas, coagulação do citoplasma e lise celular (Solórzano-Santos; Miranda-Novales, 2012). Portanto, para avaliar a influência dos óleos sobre o comportamento dos isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, foram aplicadas doses sub-letais, ou seja, doses abaixo da CMI. Os óleos essenciais usados nesse estudo foram extraídos de plantas com características medicinais e que em estudo realizado por Costa et al. (2008) inibiram in vitro o crescimento de alguns isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

O crescimento das células planctônicas foi fortemente reduzido devido a aplicação de doses sub-MCIs de laranja doce, isso pode ser justificado, pois as células bacterianas que estão na forma planctônica (forma sésil de crescimento), são mais sensíveis a agentes nocivos, como os óleos essenciais. Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida et al. (2013), com o óleo de capim limão, apresentando uma atividade microbicida e microbiostática. Reduções de 60,0 % no crescimento das células planctônicas de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* também foi verificada com uso de extratos vegetais obtido a partir da folha de *Homalepis ferruginea* (Silva et al. 2020).

A capacidade das bactérias de se aderir e formar biofilmes é um fator importante que contribui para sua resistência e persistência em diferentes ambientes e contra agentes

antimicrobianos principalmente no campo (Flemming et al. 2016). Várias estratégias são estudadas para evitar a adesão dessas bactérias as superfícies, e o uso de compostos naturais e seus principais constituintes têm mostrado potencial para inibir a formação de biofilme (Ortega-Ramirez et al. 2017; Tapia-Rodriguez et al. 2017; Gutierrez-Pacheco et al. 2018). Nesse contexto, todos os óleos essenciais usados no presente trabalho, demonstraram potencial significativo para inibição da formação do biofilme, possuindo aplicabilidade contra *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Dentre os seis isolados testados, CCRMPCB18 foi o mais sensível a ação de agentes antimicrobianos, tendo uma redução drástica na formação de biofilme. No entanto, esse comportamento foi atípico entre os isolados, os quais em sua maioria apresentaram uma menor redução na taxa de formação do biofilme, inclusive com um isolado não tendo redução na formação de biofilme (CCRMPCB362). Essas diferenças podem ser devido a existência da variabilidade genética existente entre os isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Moraes, 2018), o poderia causar respostas distintas na sensibilidade a compostos antimicrobianos, na formação de biofilmes e no crescimento planctônico à agentes antimicrobianos. Essas variações na ação de óleos essenciais na formação de biofilme também foram observadas entre diferentes em isolados de *Sphingomonas* (Szczepanski e Lipski et al. 2014).

Óleo essencial de Bergamota reduziu a formação do biofilme, porém estimulou o crescimento planctônico de alguns isolados testados, o que sugere que a ação antibiofilme do óleo provavelmente está relacionada a inibição do processo de adesão das células. A avaliação do crescimento bacteriano foi realizada para confirmar se os óleos essenciais nas doses testadas possuíam efeito letal no crescimento de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e, assim, observar o nível de interferência sobre a bactéria. Observou-se que a presença dos óleos essenciais nas doses estudadas não alterou a cinética de crescimento da bactéria, pois a taxa de crescimento das bactérias tratadas com os óleos essenciais foi reduzida, sendo a maior redução observada para o óleo de citronela. A motilidade bacteriana desempenha um papel importante na adesão e colonização, e

contribuem para o desenvolvimento de biofilmes maduros (Malumud et al. 2011), fornecendo uma vantagem de sobrevivência sob uma variedade de ambientes, permitindo as bactérias responderem a condições favoráveis ou desfavoráveis para competirem com sucesso com outros microrganismos (Darnton et al. 2010), esse movimento pode ser alcançado através de alguns mecanismos, dentre eles é o *swarming*, é o movimento multicelular de bactéria através da superfície e é realizado por meio de flagelos rotativos helicoidais (Kearns e Losick, 2003). O efeito das doses sub-letais dos óleos essenciais na motilidade *swarming* foi diferente entre os isolados. O óleo essencial de laranja doce promoveu um aumento na motilidade em todos os isolados testados, semelhantemente ao observado para os óleos essenciais de *Hyssopus officinalis* e *Zataria multiflora*, os quais promoveram um aumento na taxa da motilidade *swarming* em isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Hajian-Maleki et al. 2019). Adicionalmente, é provável que esse aumento seja, um comportamento adaptativo da espécie para escapar de agentes antibacterianos (Linares et al. 2006). Porém para os isolados CCRMPCB66 e CCRMPCB313 com exposição a doses sub-MCIs dos óleos de alecrim e eucalipto, respectivamente, verificou-se uma redução na motilidade. A motilidade é um fator de virulência de grande importância para assegurar a colonização de plantas por fito bactérias (Siraranjani et al. 2016).

A maioria dos óleos essenciais reduziu a severidade final e AACPD dos isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Outras pesquisas também mostraram a eficiência de óleos essenciais no controle da podridão mole causada por diversas espécies e subespécies de *Pectobacterium*. Szpiter et al. (2014) verificaram que extrato de *Dionaea muscipula* aplicado em tubérculos de batata, diminuiu a severidade da podridão mole causada por *P. atrosepticum*. O óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* na concentração de 0,5% apresentou uma eficácia semelhante ao antibiótico de uso agrícola Mycoshield® na redução da severidade final (52,0 e 58,7%) e na área abaixo da curva de progresso podridão mole (37,0 e 48,5%) em couve chinesa causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Silva et al. 2012). Também no patossistema couve-chinesa e *P.*

carotovorum subsp *carotovorum* a severidade da doença foi reduzida com os óleos essenciais de copaíba, laranja doce, hortelã, *E.citriodora* e bergamota a 0,5%, foram eficientes na redução (Guerra et al. 2014).

Os principais constituintes presentes nos óleos essenciais de alecrim, citronela, cravo e capim limão foram, respectivamente, a canfora, limoneno, eugenol e mircenol. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais depende da composição química e da quantidade de cada componente, e dos princípios ativos encontrados nessas substâncias, que são responsáveis pelos efeitos terapêuticos (Halfeld-Vieira et al. 2004). Dentre esses compostos, destacam-se os terpenos (Cunha et al. 2009), os quais foram encontrados no óleo de alecrim utilizado no presente estudo. A quantidade de monoterpenos e fenóis presentes no óleo essencial de alecrim possui uma notável atividade antimicrobiana (Gutierrez et al. 2008). Joshi et al. (2015) relataram que os compostos fenólicos presentes em diversos óleos essenciais foram capazes de reduzir a capacidade de maceração de enzimas secretadas por bactérias do gênero *Pectobacterium* em diversas plantas hospedeiras.

O presente estudo demonstrou claramente o potencial dos óleos de alecrim, cravo, capim limão e citronela, como uma alternativa promissora para o controle da podridão mole, pois eles contêm compostos fitoquímicos que interferem no crescimento e determinantes da patogenicidade de isolados de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e foram capazes de reduzir a severidade da doença em couve chinesa. Além disso, o possível uso de óleos essenciais permitirá um menor impacto ambiental, proporcionando uma maior sustentabilidade, como a redução do uso de fungicidas cúpricos.

Referências

Almeida, RBA, Akisue, G, Cardoso, LML, Junquiera, JC, Jorge, Ao (2013) Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stap. On *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* sp.

Borges DF, Lopes EA, Moraes ARF, Soares MS, Visôto LE, Oliveira CR, Valente VMM (2018) Formulation of botanicals for the control of plant-pathogens: a review. *Crop Protection* 110: 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.003>

Costa CMGR, Santos MS, Barros HMM, Agra, PFM, Farias MAA (2008) Inibição do crescimento bacteriano *in vitro* de *Erwinia carotovora* pelo óleo essencial de alecrim. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 2(2): 7-10

Czajkowski R, Pérombelon MCM, Jafa S, Lojkowska E, Potrykus M, Van Der Wolf JM, Sledz W (2015) Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Ann Appl Biol* 166(1): 18–38. <https://doi.org/10.1111/aab.12166>

Darnton NC, Turner L, Rojevsky S, Berg HC (2010) Dynamics of bacterial swarming. *Biophysical Journal* 98(10): 2082-90.

Dartora AB, Bertolin TE, Bilibio D, Silveira MM, Costa JAV (2002) Evaluation of fungi and inducers for the production of endo-polygalacturonase by solid state fermentation. *Naturforsch* 57:666-670. <https://doi.org/10.1111/aab.12166>

Davidsson PR, Kariola T, Niemi O, Palva T (2013) Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Front Plant Sci* 4: 191. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.04.001>

El-Habbak M, Refaar H (2019) Molecular detection of the causative agent of potato soft rot, *Pectobacterium carotovorum*, in Egypt and essential oils as a potentially safe tool for its management. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 29(55): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0104-1>

Flemming H, Wingender C, Szewzyk JU, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016) Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Natural Reviews in Microbiology* 14(9): 563-575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

Ghalem BR (2016) Essential oils as antimicrobial agents against some important plant pathogenic bacteria and fungi. In: Choudhary DK, Varma A, Tuteja N (Eds.) Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture. Springer, Singapore, pp 271–296

Gill AO, Delaquis P, Russo P, Holley RA (2002) Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int J Food Mic* 73: 83-92. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00712-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00712-7)

Guerra M, Guerra YL, Souza EB, Mariano RL (2014) Essential plant oils in reducing the intensity of soft rot in Chinese cabbage. *Revista ciência agrônômica* 45(4): 760-766. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000400014>

Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P (2008) The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol* 124(10): 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>

Gutierrez-Pacheco MM, Gonzalez-Aguilar GA, Martinez-Tellez MA, Lizardi-Mendoza J, Madera-Santana TJ, Bernal-Mercado AT, Vazquez-Armenta FJ, Ayala-Zavala JF (2018) Carvacrol inhibits biofilm formation and the production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Food control* 89: 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.007>

Hajian-Maleki H, Ravari SB, Moghaddam M (2019) Efficiency of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, causing potato soft and their possible application as coatings in storage. *Postharvest Biology and Technology* 156: 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.06.002>

Halfeld-Vieira BA, Romeiro RS, Mizubuti ESG (2004) Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. *Fitopatologia Brasileira* 29:638-643. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000600007>

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Von Wright A (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on gram-

negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3590–3595.
<https://doi.org/10.1021/jf980154m>

Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3(12): 1-24.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>

Javadpour MM, Juban MM, Lo WCJ, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, McLaughlin ML (1996) De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem* 39(16): 3107-3113. <https://doi.org/10.1021/jm9509410>

Jeong MR, Park PB, Kim DH, Jang YS, Jeong HS, Choi SH (2009) Essential oil prepared from *Cymbopogon citrates* exerted an antimicrobial activity against plant pathogenic and medical microorganisms. *Mycobiology* 37(1): 48-52. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.1.048>

Joshi JR, Burdman S, Lipsky A, Yedidia I (2015) Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium*. *Research in Microbiology* 166(6): 535–545.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.04.004>

Kado CI (2010) *Plant Bacteriology*. The American Phytopathological Society, USA

Kearns DB, Losick, R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 49(3): 581-590.

Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL (2006) Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci* 103(51): 19484-19489.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0608949103>

Lucas GC, Alves E, Pereira RB, Perina FJ, Souza RM (2012) Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. *Pesq. agropec bras* 47(3): 351-359. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000300006>

Mansfield J, Genin S, Magoei S, Citovsky V, Sriaritanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in

molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>

Mari M, Bautista-Baños S, Sivakumar D (2016) Decay control in the postharvest system: role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biology and Technology* 122(61): 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.014>

Mariano RLR, Assis SMP (2015) Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano RLR, Silveira EB (Eds.) *Manual de práticas em fitobacteriologia*, 2ª edn. UFRPE, Recife, pp 37-49

Moraes AJG (2018) Diversidade de bactérias causadoras de podridão mole em hortaliças no estado de Pernambuco. Tese, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife

Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6(12): 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 5ª ed. NCCLS document M7A5. Wayne, Pennsylvania, United States

Ortega-Ramirez LA, Silva-Espinoza BA, Vargas-Arispuro I, Gonzalez-Aguilar JA, Cruz-Valenzuela MR, Nazzaro F, Ayala-Zavala JF (2017) Combination of *Cymbopogon citratus* and *Allium cepa* essential oils increased antibacterial activity in leafy vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97: 2166–2173. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8025>

Ren J, Petzoldt R, Dickson MH (2001) Screening and identification of resistance to bacterial soft rot in *Brassica rapa*. *Euphytica* 118: 271-280. <https://doi.org/10.1023/A:1017522501229>

Silva CL, Souza EB, Felix KCS, Santos AMG, Silva MV (2012) Óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão mole em alface crespa. *Horticultura Brasileira* 30(4): 632-638. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000400012>.

Solórzano-Santos f, Miranda-Novales MG (2012) Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23(2) : 136-141.

Silva, PHR., da Conceição, CS., Leal, CM, Seilva, WJ., Gama, MAS., Silva, MV., Souza, EB (2020) Caatinga biome plant extracts affect the planktonic growth and biofilm formation of *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. *J Plant Pathol* (2020). <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00585-4>

Sivaranjani MS, Krishnan R, Kannappan A, Ramesh M, Ravi AV (2016) Curcumin from *Curcuma longa* affects the virulence of *Pectobacterium wasabiae* and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* via quorum sensing regulation. *European Journal of Plant Pathology* 146(4): 793-806. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0957-z>

Szczepanski S, Lipski A (2014) Essential oils show specific on the formation of bacterial biofilm. *Food Control* 36(1): 224-229. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.023>

Szpitter A, Narajczyk M, Maciag-Dorszynska M, Wegrn G, Lojkowska E, Królicka A (2014) Effect of *Dionaea muscipula* extract and plumbagin on maceration of potato tissue by *Pectobacterium atrosepticum*. *Annals of applied biology* 164(3): 404-414. <https://doi.org/10.1111/aab.12110>

Tapia-Rodriguez MR, Hernandez-Mendoza A, Gonzalez-Aguilar GA, Martinez-Tellez M.A, Martin CM, Ayala-Zavala JF (2017) Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food control* 75: 255-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.014>

Tabela 1 Atividade microbiana de sete óleos essenciais determinado através da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) de seis isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

Óleos	CMI (mg mL ⁻¹)	CMB (mg mL ⁻¹)	CMB/CMI ^a	SUB-CMI
CCRMPCB18				
Eucalipto	3,12	3,12	1	1,56
Bergamota	1,56	1,56	1	0,78
Citronela	1,56	1,56	1	0,78
Laranja Doce	100	100	1	50
Cravo	0,39	0,39	1	0,19
Capim Limão	0,39	0,39	1	0,19
Alecrim	0,78	0,78	1	0,39
CCRMPCB66				
Eucalipto	0,78	0,78	1	0,39
Bergamota	1,56	1,56	1	0,78
Citronela	1,56	1,56	1	0,78
Laranja Doce	50	50	1	25
Cravo	0,39	0,39	1	0,19
Capim Limão	0,39	0,39	1	0,19
Alecrim	0,39	0,39	1	0,19
CCRMPCB175				
Eucalipto	1,56	1,56	1	0,78
Bergamota	50	50	1	25
Citronela	0,39	0,39	1	0,19
Laranja Doce	-	-	-	-
Cravo	0,39	0,39	1	0,19
Capim Limão	0,39	0,39	1	0,19
Alecrim	3,12	6,25	2	1,56
CCRMPCB313				
Eucalipto	1,56	1,56	1	0,78
Bergamota	1,56	1,56	1	0,78
Citronela	1,56	1,56	1	0,78
Laranja Doce	100	100	1	50
Cravo	0,39	0,39	1	0,19
Capim Limão	0,39	0,39	1	0,19
Alecrim	0,78	0,78	1	0,39
CCRMPCB362				
Eucalipto	0,78	0,78	1	0,39
Bergamota	1,56	1,56	1	0,78
Citronela	1,56	1,56	1	1,56
Laranja Doce	100	100	1	50
Cravo	0,39	0,39	1	0,19
Capim Limão	0,39	0,39	1	0,19
Alecrim	0,78	0,78	1	0,39
CCRMPCB642				
Eucalipto	3,12	3,12	1	1,56
Bergamota	0,39	1,56	4	0,19
Citronela	1,56	1,56	1	0,78

Laranja Doce	100	100	1	50
Cravo	0,39	0,39	1	0,19
Capim Limão	0,39	0,39	1	0,19
Alecrim	0,39	0,78	2	0,19

a: A razão entre os valores da CMB/CMI: (≤ 4) ação bactericida e (≥ 4) bacteriostática

-: Não teve efeito inibitório

Tabela 2 Crescimento de células planctônicas (DO_{570}) de seis isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (CCRMPCB18, CCRMPCB66, CCRMPCB175, CCRMPCB313, CCRMPCB362 e CCRMPCB642), após a exposição a doses sub-CMI, de sete óleos essenciais

	ISOLADOS					
	CCRMPCB18	CCRMPCB66	CCRMPCB175	CCRMPCB313	CCRMPCB362	CCRMPCB642
Controle	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Alecrim	85,0 ^a	0,0*	240,9 *	26,9 *	38,6 *	83,3
Bergamota	175,0	276,9*	13,6 *	92,3	89,5	170,8*
Capim limão	135,0	76,9	181,8 *	36,5*	33,3 *	129,1
Citronela	15,0	34,6	100,0	17,3 *	12,8 *	16,7 *
Cravo	145,0	192,3	109,0*	90,4	82,45 *	129,1
Eucalipto	10,0 *	153,8	245,5 *	0,0 *	22,9 *	25,0 *
Laranja doce	0,0 *	0,0 *	-----	0,0 *	0,0 *	0,0 *
C.V.(%)	16,48	23,56	5,72	4,16	3,19	4

a Valores representam a média da absorbância

- Não apresentou efeito inibitório

* Diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Dunnett's ($P \leq 0.05$)

Tabela 3 Constituintes dos óleos essenciais de alecrim, citronela, cravo e capim limão identificados por CG/EM

	Óleos essenciais			
	Alecrim	Citronela	Cravo	Capim limão
Constituintes	Cânfora	Limoneno	Eugenol	Mirceno
	Eugenol	α – terpinoleno	Acetato de eugenol	Neral
	Limoneno	Citronelal	α - copaeno	Geraniol,
	Mirceno	β – citronelol	α -humuleno	Geranial
	α –pineno	Nerol (2,6-octadienol)	-	Linalol
	β pineno	Citral	-	-
	β -cariofileno	Geranil acetato	-	-
	Canfeno	β – elemeno	-	-
	Verbenona	β – copaeno	-	-
	Isoborneol	δ – amorfeno	-	-
	Terpineno	-	-	-
	Linalol	-	-	-
	α -felandreno	-	-	-
	Geraniol	-	-	-
	Geranial	-	-	-

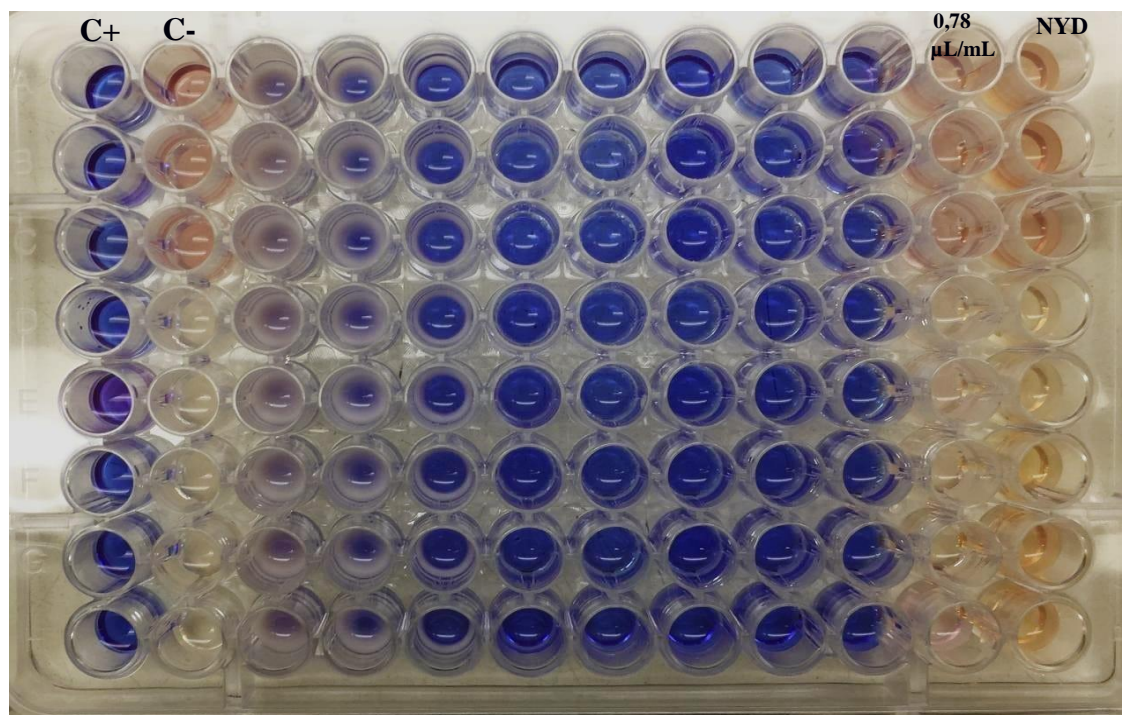


Fig. 1. Placa de 96 poços com meio de cultura NDY com diferentes doses do OE de alecrim, após adição de resaurina sódica 0,01 % para a determinação da viabilidade celular do isolado CCRMPCB66.

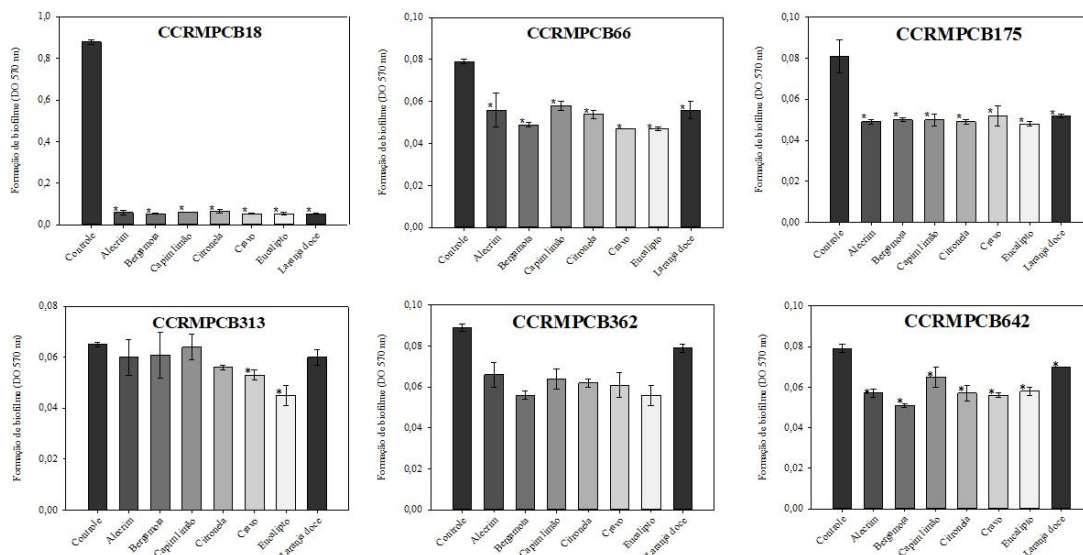


Fig. 2 Formação de biofilme de isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (CCRMPCB18, CCRMPCB66, CCRMPCB175, CCRMPCB313, CCRMPCB362 e CCRMPCB642), após a exposição a doses sub-CMI, de sete óleos essenciais (tabela 1). *Diferença estatística a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett. O controle constituiu da cultura bacteriana sem a exposição aos compostos.

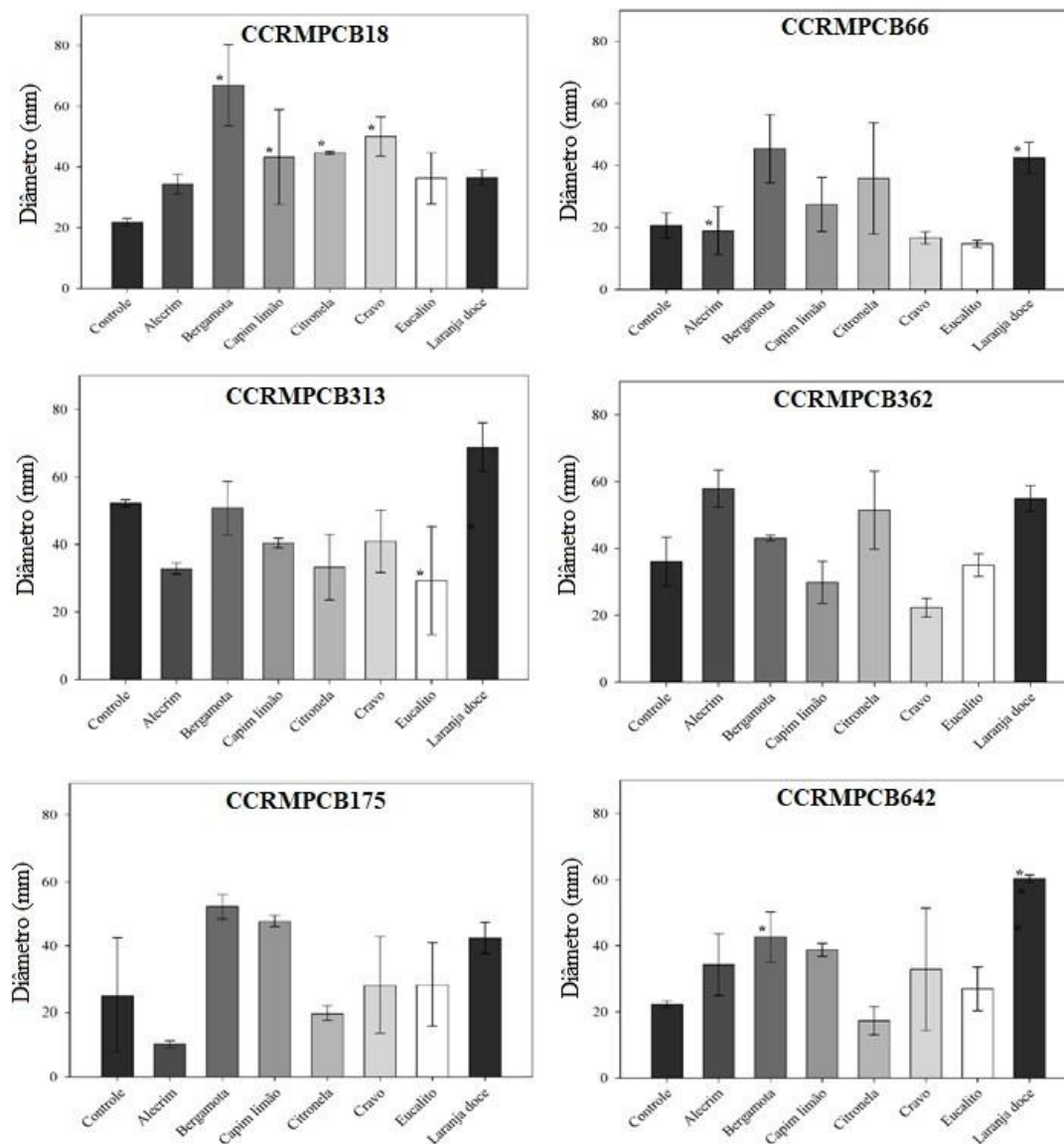


Fig. 3 Motilidade *swarming* de isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (CCRMPCB18, CCRMPCB66, CCRMPCB175, CCRMPCB313, CCRMPCB362 e CCRMPCB642), após a exposição a doses sub-MCIs de sete óleos essenciais (tabela 1) *Diferença estatística a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet.

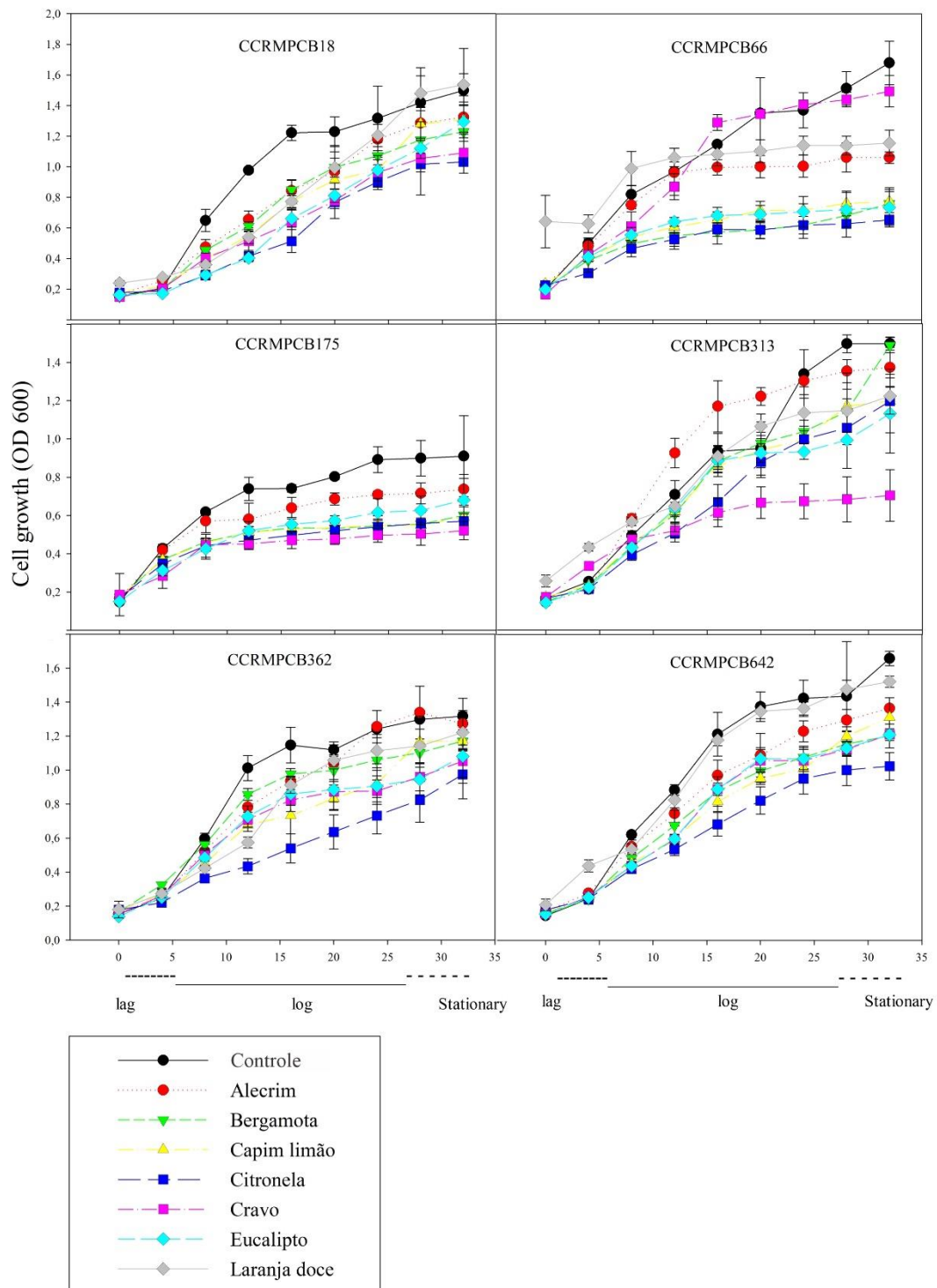


Fig. 4: Curva de crescimento de isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* após a exposição a doses sub-MCIs de sete óleos essenciais (tabela 1)

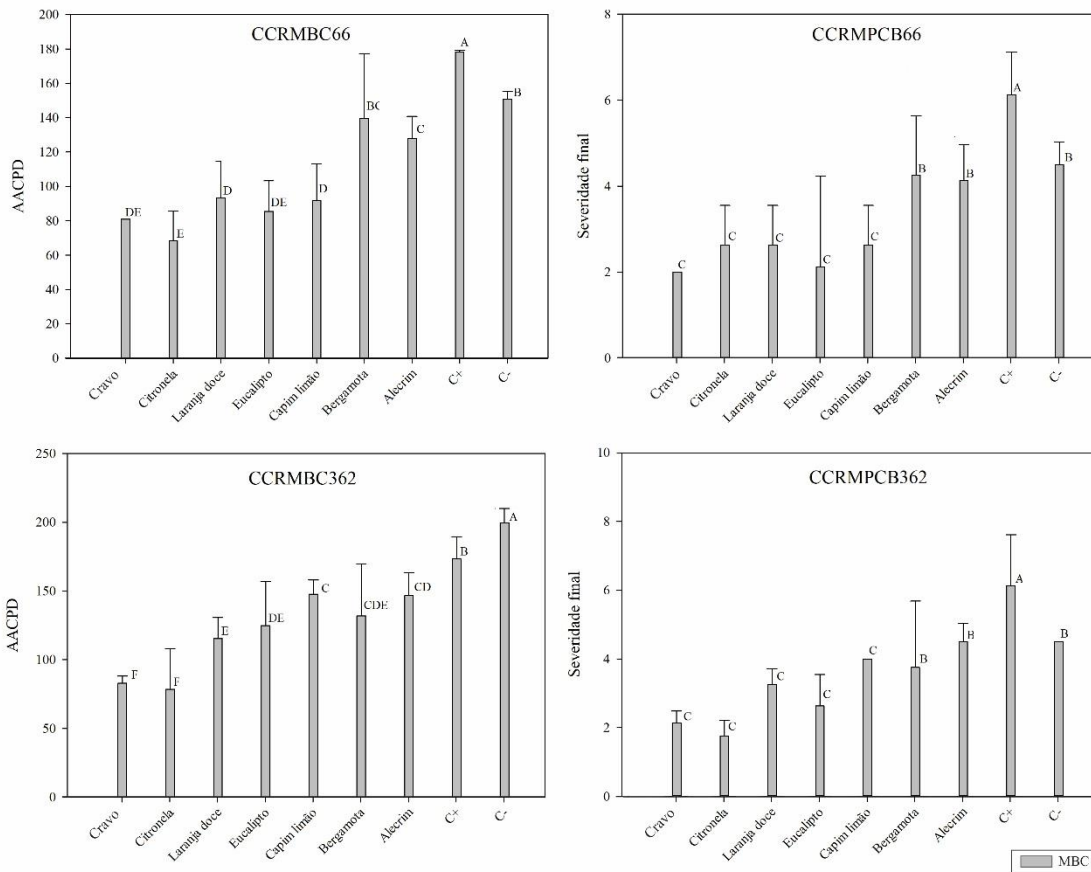


Fig. 5 Influência de óleos essenciais na concentração bacteriana mínima (MBC) de cravo citronela, laranja doce, eucalípto, capim limão, bergamota e alecrim (Tabela 1) aplicados via pulverização, na severidade e área abaixo da curva de progresso da podridão mole (AACPD) em couve-chinesa (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) inoculadas com isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*. * Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste LSD ($P \leq 0.05$).

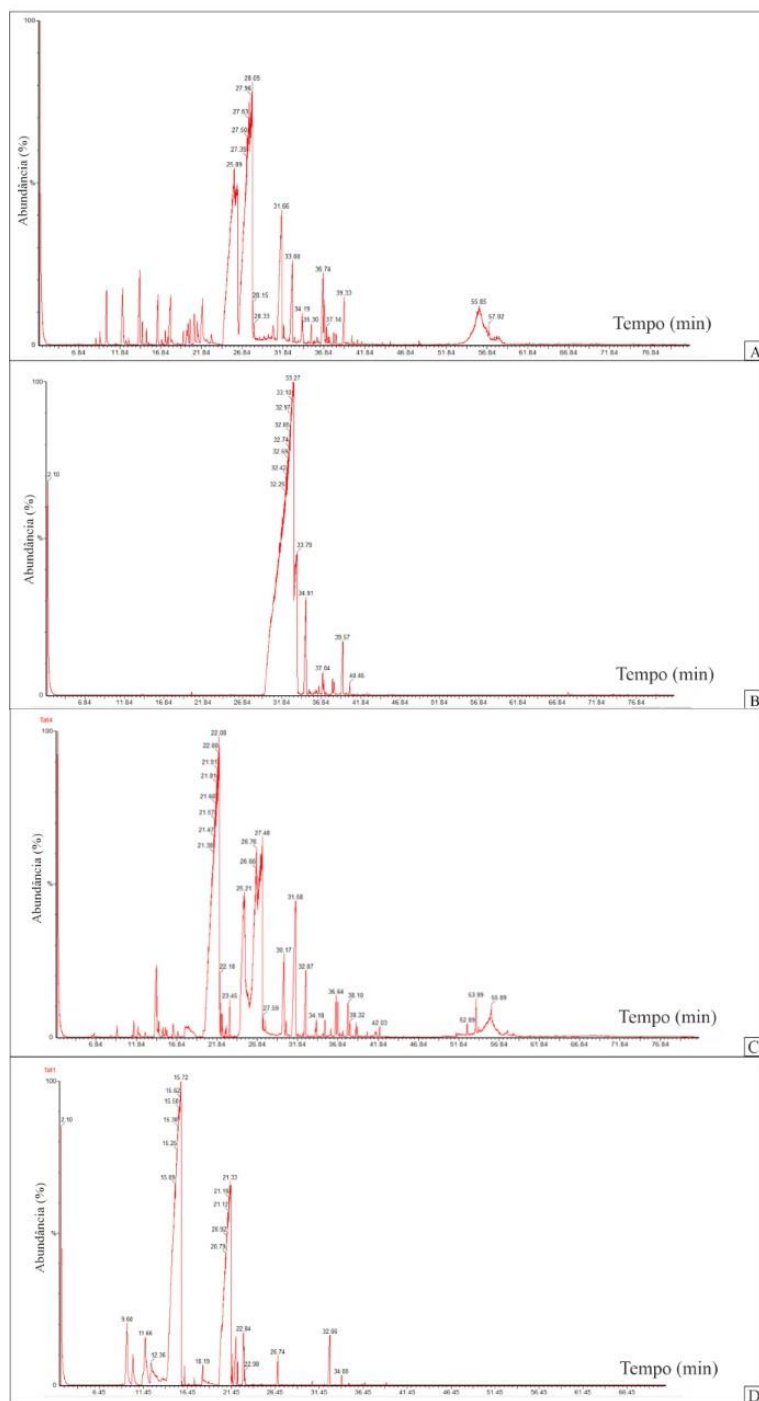


Fig. 7. Cromatograma de íons totais CG-MS dos óleos essenciais de A. Capim limão; B. cravo; C. citronela; e D. alecrim.

CAPÍTULO IV

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

A temperatura ideal de crescimento *in vitro* para os isolados de *Pcb* foi de 24,7 °C;

As condições que predisuseram a ocorrência de uma maior severidade da podridão mole em couve-chinesa foram elevadas concentração de inoculo (10^9 UFC/mL), em conjunto com temperatura de 30 °C e umidade relativa elevada, próxima a 100% durante 48 h;

Os óleos essenciais de alecrim, bergamota, capim limão, citronela, cravo, eucalipto, laranja doce possuem atividade antimicrobiana;

Os óleos essenciais de cravo, citronela, laranja doce, capim limão, eucalipto, podem ser explorados como uma nova tecnologia para o manejo da podridão mole em couve-chinesa.