



ANDRÉS MAURICIO PINZÓN NÚÑEZ

**PRODUTOS ALTERNATIVOS CONTROLAM A
PODRIDÃO NEGRA E AUMENTAM A
ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGADAS À DEFESA
EM COUVE**

LAVRAS – MG

2015

ANDRÉS MAURICIO PINZÓN NÚÑEZ

**PRODUTOS ALTERNATIVOS CONTROLAM A PODRIDÃO NEGRA E
AUMENTAM A ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGADAS À DEFESA EM
COUVE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

Coorientador

Dr. Fernando Pereira Monteiro

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Núñez, Andrés Mauricio Pinzón.

Produtos alternativos controlam a podridão negra e aumentam a atividade de enzimas ligadas à defesa em couve / Andrés Mauricio Pinzón Núñez. – Lavras : UFLA, 2015.

61 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros.
Bibliografia.

1. Controle alternativo. 2. *Brassica oleracea* var. *acephala*.
3. Podridão negra. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ANDRÉS MAURICIO PINZÓN NÚÑEZ

**PRODUTOS ALTERNATIVOS CONTROLAM A PODRIDÃO NEGRA E
AUMENTAM A ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGADAS À DEFESA EM
COUVE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de agosto de 2015.

Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA

Dr. Paul W. Pare TTU

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

Dr. Fernando Pereira Monteiro
Coorientador

LAVRAS – MG

2015

A DEUS, primeiramente.

Aos meus amados pais, Alcira Nuñez Bermudez e Luis Danilo Pinzón

Camacho.

Ao meu querido irmão, Danilo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, primeiramente, por fazer possível cumprir um de meus sonhos e por cada conquista durante meu passar pela vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha mãe, Alcira Núñez, por ser, além de mãe, uma conselheira e sempre me indicar o caminho certo. A meu pai e irmão por sempre me mandar mensagem para não desistir.

Ao professor, Flávio Henrique Medeiros Vasconcelos, por me aceitar como orientado de mestrado, pela amizade, paciência e conselhos.

Ao professor Fernando Monteiro pela amizade e por me ajudar no desenvolvimento do experimento.

Ao colega Gabriel Alvarez pela amizade e colaboração durante todo o transcurso do experimento.

Ao professor Luiz Antonio, do Departamento de Agricultura, por facilitarem a área de trabalho.

Ao professor Mario Sobral por seus conselhos e amabilidade.

À minha amiga Mirella Almeida por me acolher durante minha estadia no Brasil.

À Ana, do laboratório de bacteriologia, por me ajudar em todo o que precisei.

À Tina e a Cleusa, do Departamento de Alimentos, pela colaboração no desenvolvimento de meu experimento.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a concretização desse sonho.

RESUMO

A podridão negra, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), é a principal doença da couve no Brasil e seu manejo, ainda, é um desafio na agricultura urbana, fomentando novas pesquisas para seu controle. Com o objetivo de avaliar a eficácia de produtos alternativos no controle preventivo da podridão negra da couve, foram avaliados soro de leite (10% v/v), calda sulfocálcica (100%), biofertilizante (20% v/v), calda bordalesa (100%), leite cru (10% v/v) e a testemunha água. As aplicações dos tratamentos foram realizadas, a cada 15 dias, a partir dos 35 após o transplante, totalizando 3 aplicações. A inoculação da bactéria foi feita 8 dias, depois da primeira aplicação dos tratamentos e o ensaio foi conduzido em época de alta precipitação pluviométrica. A severidade da doença foi avaliada aos 5, 10 e 15 dias após a inoculação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott knott ($P < 0,05$). Os efeitos dos tratamentos na ativação de respostas de defesa e propriedades nutricionais da couve foram avaliados pela análise de composição centesimal (umidade, fibra bruta, proteína bruta, lipídios e cinzas), análise de fenóis totais e atividade antioxidante. Após os resultados obtidos no experimento de campo, objetivou-se estudar o efeito dos dois produtos mais promissores no controle da doença, na ativação de respostas de defesa, análise de atividade da peroxidase de guaiacol (POX), catalase (CAT) e fenilalanina amônia-lyase (PAL), como também o conteúdo de ligninas e fenóis totais, observando-se que a aplicação foliar do biofertilizante e a leite cru proporcionaram incremento. No experimento de campo, houve uma redução da AACPD apenas para los tratamentos leite cru (39%) e biofertilizante (51%) comparado à testemunha. Na composição centesimal os resultados obtidos foram semelhantes comparados com dados nutricionais de diferentes autores. Na quantificação de fenóis totais e DPPH os melhores ou mais eficazes em sequestrar o radical livre sem a inoculação do patógeno foram o biofertilizante cujo percentual de inibição, foi superior a 84%, seguida pelo leite cru e soro de leite, 80% e 77% respectivamente. O potencial de sequestro diminuiu consideravelmente em plantas de couve inoculadas com *X.campestris* pv. *campestris*. Por estes resultados, sugere-se que o biofertilizante, à base de esterco de gado e melaço, é uma alternativa promissora para integrar o manejo agroecológico da podridão negra da couve.

Palavras-chave: Controle alternativo. Podridão negra. *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Horticultura urbana.

ABSTRACT

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc) which causes black rot in cabbage, is a serious disease in Brazil. Its management is a challenge for urban agriculture. In order to elaborate an alternative solution for managing this disease, we evaluated five different products: whey (10% v / v), lime sulfur (100%), bio fertilizer (20% v / v), bordeaux mixture (100%), raw milk (10% v /v) and water as control. The products were applied every 15 days, starting from 35 days after transplanting. The bacterium was inoculated eight days after the first application. The experiment was conducted in the summer, wet and warm period. The severity of black rot was evaluated (5, 10 and 15 days after the appearance of the first symptom in the control). The data obtained was used to calculate the area under the disease progress curve (AUDPC). In order to determine the benefits of all five treatments, we evaluated nutraceutical-related variables (DPPH radical, crude fiber, crude protein, lipids and total phenolic compounds). For the two treatments resulting in highest disease control, the induced resistance potential of the products was determined by the activities of phenylalanine ammonia lyase (PAL), catalase (CAT), peroxidase of guaiacol (POX), lignin and total phenolic compounds. In field evaluation, the treatments of raw milk and bio fertilizer presented the lowest AUDPC, reducing the disease by 39 and 51%, when compared to the control. In the treatment with raw milk, we verified increased crude protein and fiber in leaves compared to the control when plants were inoculated with Xcc, increase in DPPH radical and total phenolic compounds, and, in the treatment with bio fertilizer, increased lipids in the experiment without bacteria. With the application of bio fertilizer, we verified higher activity of POX and CAT, when compared to the control and plants treated with Xcc. In quantification of total phenols and DPPH the best or most efficient in free radical scavenging without pathogen inoculation were biofertilizer which the percentage inhibition was higher than 84%, then the raw milk and whey, 80% and 77% respectively. Therefore, the application of bio fertilizer is a promising alternative for the control of black rot in cabbage, and is also beneficial for human food quality.

Key words: Alternative control. Black rot. *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Urban agriculture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Delimitação experimental. T1-testemunha (água), T2-Soro de leite (10% v/v), T3-Calda sulfocálcica (100%), T4-biofertilizante (20% v/v), T5- Calda bordalesa (100%), T6-leite cru (10% v/v).....22
- Figura 2 Delineamento experimental (estação experimental do Câmpus de Desenvolvimento Tecnológico da UFLA).....22
- Figura 3 Severidade da podridão negra ao longo do tempo após inoculação.....38
- Figura 4 Precipitação, umidade relativa e temperatura durante o período de condução dos experimentos, com letras mostrando os períodos de aplicação dos tratamentos (a: 1º aplicação, exp. 1*, b: 2º aplicação, exp.1 * e 1º aplicação, exp.2*, c: 3º aplicação, exp. 1*, 2º aplicação, exp. 2*, d: 3º aplicação exp. 2*, e: 1º aplicação, exp).....40
- Figura 5 Correlação de Pearson ($P \leq 0.05$) das variáveis dos 2 experimentos sem o patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*44
- Figura 6 Correlação de Pearson ($P \leq 0.05$) das variáveis dos 2 experimentos sem o patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Severidade da podridão negra aos 5, 10 e 15 dias após inoculação.....	35
Tabela 2	Severidade da podridão negra aos 5, 10 e 15 dias após inoculação.....	37
Tabela 3	Composição centesimal, fenóis totais e DPPH dos experimentos 1 e 2 sem o patógeno <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>	42
Tabela 4	Composição centesimal, fenóis totais e DPPH dos experimentos 3 e 4 em presença do patógeno <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	46
Tabela 5	Atividade das enzimas peroxidase (POX) nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento	48
Tabela 6	Atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento	49
Tabela 7	Atividade da enzima Catalase (CAT) nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento.....	50
Tabela 8	Determinação da lignina nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento	50
Tabela 9	Determinação de fenóis totais nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Agricultura urbana	14
2.2	Segurança alimentar urbana	15
2.3	Doença das Crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, couve-flor, rabanete, repolho e rúcula)	16
2.3.1	Podridão Negra (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>)	16
2.4	Controle alternativo	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Experimento I - Avaliação da severidade de podridão negra (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>) em couve após pulverização com diferentes controles alternativos	21
3.1.1	Área de estudo, montagem dos experimentos e tratamentos	21
3.1.2	Obtenção e multiplicação do isolado de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	23
3.1.3	Obtenção e preparação dos produtos alternativos	24
3.1.4	Delineamento experimental	25
3.1.5	Dados meteorológicos	26
3.1.6	Determinação da atividade antioxidante	27
3.1.7	Determinação de compostos fenólicos	27
3.2	Composição centesimal	27
3.2.1	Determinação de umidade	28
3.2.2	Determinação de extrato etéreo	28
3.2.3	Determinação de proteína bruta	28
3.2.4	Determinação de fibra bruta	28
3.2.5	Determinação da fração cinza	29
3.3	Experimento II - Atividade de enzimas ligadas à proteção de plantas de couve após pulverização com diferentes controladores alternativos	29
3.3.1	Delineamento experimental	29
3.3.2	Obtenção e multiplicação do isolado de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	30
3.3.3	Análise da atividade enzimática	30
3.3.3.1	Peroxidase de guaiacol	30
3.3.3.2	Catalase	31
3.3.3.3	Fenilalanina amônia-liase	31
3.3.4	Preparo de tecidos foliares para a avaliação de lignina solúvel e de fenóis solúveis totais	32
3.3.4.1	Determinação de lignina solúvel	32

3.3.4.2	Determinação de fenóis solúveis totais	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	Avaliação da severidade de podridão negra (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>) em couve após pulverização com diferentes controles alternativos.....	35
4.1.1	Análise centesimal.....	40
4.1.2	Fenóis totais e DPPH	43
4.2	Experimento II - Atividade de enzimas ligadas à proteção de plantas de couve após pulverização com diferentes controladores alternativos	47
4.2.1	Atividade das enzimas POX, PAL e CAT	47
4.2.2	Determinação de lignina	50
4.2.3	Determinação de fenóis totais.....	51
4.2.4	Peroxidase (POX), Fenilalanina amônia-liase (PAL) e Catalase (CAT)	51
5	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Quando se trata especificamente das hortas urbanas, percebem-se os riscos relativos ao uso de agrotóxicos já que, na maioria das vezes, as hortaliças e demais produtos da horta são consumidos *in natura*, constituindo risco à saúde, inclusive, pelo comum não cumprimento do período de carência após as aplicações (COUTINHO, 2009; MARTIN; OUDWATER; GÜNDEL, 2001). O convívio facilitado pela agricultura em ambientes urbanos de produtores/produção e consumidores também tem aumentado a pressão pelo uso de tecnologias de produção com menor impacto ao meio ambiente, às pessoas e à saúde (SANTRANDEU; LOVO, 2007). Diante de todas estas considerações, é evidente que os métodos de produção agroecológicos apresentam potencial de resposta a tais demandas.

Outra característica marcante do modo de produção agrícola em ambientes urbanos é a sensibilidade destes sistemas à utilização de defensivos químicos, dentre eles, os fungicidas. Esta característica tem suscitado discussões acerca da segurança do uso de agrotóxicos em ambientes urbanos, como, por exemplo, a nota técnica publicada pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), que proíbe o uso de agrotóxicos em áreas urbanas. A proibição se justifica, por se tratar de áreas com circulação frequente de pessoas, proximidade às residências e risco de contaminação dos recursos hídricos, devido ao escoamento em áreas impermeáveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010), além do desequilíbrio biológico com a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (WIT et al., 2009).

As brássicas, em geral, destacam-se na produção olerícola do Brasil, devido ao seu alto valor nutritivo e rápido retorno econômico (STEINER et al., 2009), dentre elas, a couve manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*), uma das

hortaliças mais conhecidas e consumidas no centro-sul brasileiro, sendo produzida em pequenas propriedades e hortas urbanas, pelo seu valor nutricional e antioxidante.

Em levantamento realizado, as cultivares hoje produzidas em agricultura urbana são produtivas, mas susceptíveis ao oídio (*Oidium* sp) e podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), principal doença bacteriana das crucíferas (MARCOLINI; CECÍLIO FILHO; BARBOSA, 2005).

Dentre as alternativas de controle para estas doenças em outros cultivos em produção agroecológica, são relatados biofertilizantes, caldas e produtos à base de derivados lácteos. Apesar da eficiência comprovada destes produtos para o manejo de doenças, pouco ainda se sabe sobre seu efeito no controle da podridão negra, dessa forma, esse trabalho foi conduzido visando avaliar a eficiência destes produtos para o controle alternativo da podridão negra e avaliar variáveis relacionadas ao valor nutricional da couve (proteínas, lipídios e antioxidantes) e ativação de respostas de defesa contra patógenos, medida pela atividade de enzimas de defesa e acúmulo de lignina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agricultura urbana

A agricultura urbana, como um método de produção particular, apresenta potenciais e limitações ainda pouco explorados no nosso país. Como potencial, pode-se citar a relação direta que possui com o favorecimento da Segurança Alimentar, em qualidade e quantidade do alimento; complementação à renda dos agricultores urbanos, seja diretamente, com redução dos custos com alimentação, assim como indiretamente, permitindo o investimento em outros tipos de bens de consumo, responsáveis pela movimentação da economia local. Há, também, a vertente dos aspectos psicológicos e socioculturais movimentados pela lida com as hortas domésticas, onde a distração e possíveis resgates de valores e vivências primitivas do indivíduo podem ser suscitados (SANTRANDEU; LOVO, 2007).

São diversos os benefícios possibilitados pela agricultura urbana, contudo, um conjunto de fatores se coloca como fortes entraves ao seu desenvolvimento. Dentre as limitações, citam-se a necessidade da consideração desse setor como uma prática com potencial para melhor gerir o ambiente urbano e periurbano, através de novas políticas públicas da federação, estado e município, que reconheçam suas particularidades e busquem estratégias de apoio (SANTRANDEU; LOVO, 2007). Contudo, a falta de conhecimentos técnicos e particulares desse tipo de produção e a falta de capacitação dos próprios técnicos/extensionistas, para esse tipo de atividade, ainda têm limitado seu fortalecimento e prejudicado os ajustes nas regulamentações e políticas públicas para o setor (GUIMARÃES, 2009).

2.2 Segurança alimentar urbana

A horticultura intensiva nas periferias urbanas faz sentido. Mas, à medida que as cidades crescem, perdem-se valiosas terras agrícolas para a construção de casas, indústria e infraestrutura (a expansão absorve cerca de 2.600 hectares de terras agrícolas a cada ano). Como resultado, a produção de alimentos frescos está sendo limitada às áreas rurais. O custo do transporte, empacotamento e refrigeração, o mau estado das estradas rurais e as vultosas perdas em trânsito aumentam a escassez e o custo de frutas e hortaliças nos mercados urbanos (FAO, 2012).

Por isso, a China integra a produção de alimentos ao desenvolvimento urbano desde 1960. Hoje, mais de metade das hortaliças consumidas em Pequim vem das próprias hortas da cidade e custam menos que os produtos transportados de áreas mais distantes. A horticultura em Hanói e seus arredores produzem mais de 150.000 toneladas de frutas e hortaliças por ano. A prática da HUP intensiva, estabelecida em Cuba desde o início dos anos 1990, é responsável por 60% da produção hortícola e o consumo per capita de frutas e hortaliças dos cubanos excede o mínimo recomendado pela FAO/OMS.

À medida que a urbanização se acelera na África Subsaariana, muitos países estão procurando desenvolver sua própria horticultura comercial para assegurar a segurança alimentar urbana. Muitas vezes, o primeiro passo consiste em legalizar e proteger pequenas hortas que surgiram sem planejamento ou licença (FAO, 2012).

Na República Democrática do Congo, por exemplo, a FAO prestou assessoria sobre medidas para regularizar títulos de 1.600 ha de hortas cuidadas por cerca de 20.000 produtores em cinco cidades. O projeto introduziu variedades melhoradas de hortaliças e instalou ou melhorou 40 estruturas de

irrigação, que estenderam a disponibilidade de água e a produção, durante todo o ano.

2.3 Doença das Crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, couve-flor, rabanete, repolho e rúcula)

A família Cruciferae/Brassicaceae inclui uma grande variedade de culturas de importância econômica, cultivadas para alimentação, preparo de condimentos e plantas ornamentais. A podridão negra ocorre em todas as regiões produtoras de crucíferas em todo o mundo causando perdas na produção e qualidade das culturas (CENARGEN, 2011).

2.3.1 Podridão Negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)

A agricultura brasileira e mundial é bastante afetada por várias doenças causadas por espécies do gênero *Xanthomonas*, ocasionando, assim, perdas substanciais em várias culturas de grande importância econômica. A podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, é considerada uma das doenças mais destrutivas de crucíferas.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc) é um gênero da família da Pseudomonaceae patogênica para brássicas. Seu modo de infecção preferencial é pelos hidatódios, poros localizados às margens das folhas. No processo de degustação, gotículas de água são liberadas pelos hidatódios permitindo a entrada da bactéria na planta e possibilitando sua disseminação pelo sistema vascular (HUGOUVIEUX; BARBER; DANIELS, 1998). As bactérias se multiplicam, formando microcolônias e, em seguida, ocorre produção do polissacarídeo extracelular goma de xantana, formando-se um biofilme (LEITE et al., 2001). Esse biofilme garante que as colônias de Xcc se

estabilizem e que ocorra uma melhor proliferação bacteriana. Além disso, estudos têm sugerido um possível papel para a goma de xantana na sobrevivência de Xcc em situações de estresses causados pela planta, como a síntese de compostos antimicrobianos (DOW et al., 2003).

Além dessa doença, as culturas podem apresentar distúrbios fisiológicos não transmissíveis, geralmente, associados à nutrição da planta. Plantas mal nutridas, por sua vez, tornam-se mais vulneráveis ao ataque de patógenos (LEITE et al., 2001). É importante considerar que os sintomas de doenças podem variar de acordo com o cultivo e com as condições climáticas locais, muitas vezes necessitando de exames laboratoriais para complementar a diagnose visual (QUEZADO-DUVAL; CAMARGO, 2004).

2.4 Controle alternativo

Apesar de passar despercebida ou negligenciada pelo pequeno produtor, as doenças de plantas representam um grande entrave à produção de hortaliças, em alguns casos comprometendo completamente a produção (DAL SOGLIO, 2004). Portanto, a correta diagnose e a implementação de estratégias de manejo agroecológico de doenças de plantas são de fundamental importância para a sustentabilidade da agricultura urbana.

Os primeiros sintomas das doenças são vistos no campo pelo agricultor, o qual pode ou não saber exatamente do que se trata podendo comprometer a correta diagnose. Desse modo, a identificação correta do agente causal, associado aos sintomas observados no campo, constitui-se no primeiro ponto importante no estabelecimento de estratégias de controle. Cada doença necessita de medidas de controle específicas que devem ser adotadas na hora certa e em intervalos bem definidos (DAL SOGLIO, 2004).

Sistemas alternativos de produção de alimentos são divididos em vários seguimentos como agricultura orgânica, biodinâmica e manejo racional. O que essas linhas de pensamento têm em comum é que todas elas buscam a diminuição da utilização de agrotóxicos para o controle de doenças (STADNIK; TALAMINI, 2004).

Para trabalhar com agroecologia, a agrobiodiversidade é um conceito que se deve saber, o qual leva em consideração as dimensões da diversidade nos métodos de manejo respeitando a diversidade de espécies e sua diversidade genética. Ao demonstrar a importância da agrobiodiversidade, demonstra-se, também, a importância da sustentabilidade da diversidade genética e de espécies presentes nos agroecossistemas, sejam plantas, agentes de biocontrole ou patógenos, mas também aspectos culturais das comunidades locais (DAL SOGLIO, 2004).

No manejo de doenças em agroecossistemas, deve-se levar em consideração a maior redução possível de práticas que possam causar distúrbios e redução da biodiversidade, como por exemplo, o uso de venenos (DAL SOGLIO, 2004).

Portanto, cultivos mais sustentáveis e menos dependentes do uso de agrotóxicos podem aumentar e sustentar as interações biológicas, em vez de simplificar e reduzir essas interações (BETTIOL; GHINI, 2004).

Quando comparados aos agrotóxicos, métodos alternativos conseguem eliminar os riscos de contaminação ambiental à saúde humana e animal e causam menos impacto à biodiversidade, porque geram menores desequilíbrios biológicos por praticamente não interferirem nas populações não-alvo (BETTIOL, 2013).

Produtos alternativos como o leite de vaca cru pode ter mais de um modo de ação para controlar doenças fúngicas. Leite cru pode ter efeito direto, em razão das suas propriedades germicidas, por conter diversos sais e

aminoácidos, pode, também, induzir a resistência das plantas e/ou controlar diretamente o patógeno; pode, ainda, estimular o controle biológico natural, formando um filme microbiano na superfície da folha ou alterar as características físicas, químicas e biológicas da superfície foliar (BETTIOL; ASTIARRAGA; LUIZ, 1999). O leite cru é um complexo de nutrientes e microrganismos, comunidade composta por, aproximadamente, 300.000 bactérias (RIBEIRO; CARVALHO, 2002). Portanto, o aumento da comunidade epifítica de bactérias na superfície foliar pode advir da contribuição direta da população endógena do leite, do estímulo de bactérias nativas saprófitas pela contribuição de nutrientes do leite ou uma combinação de ambos (MEDEIROS, 2005). Crisp, Scott e Wicks (2004) comprovaram que a aplicação de leite a 10% favorece o desenvolvimento de antagonistas bacterianos (*Bacillus subtilis*) e fúngicos (*Trichoderma harzianum*) bem como de saprófitas (*Aureobasidium pullulans*).

A proteção de plantas pode ainda ser feita pelo uso de caldas sulfocálcica e bordalesa e extratos de plantas ou subprodutos da indústria como o soro de leite (BETTIOL, 2013).

O uso de biofertilizantes apresenta potencial para o controle de doenças de plantas e pode agir por meio de: antibiose (pela presença de antibióticos em sua composição); competição (presença da comunidade microbiana); indução de resistência (tanto microbiana como pelos compostos químicos presentes) e ação direta ou indireta do fornecimento de nutrientes a plantas, constituindo-se uma alternativa para os produtores orgânicos. (BETTIOL; TRATCH; GALVÃO, 1997).

Portanto, o manejo agroecológico de doenças de plantas envolve, inicialmente, a diagnose correta das doenças, seguida por iniciativas preventivas de controle, tendo em vista que estratégias de controle biológico e alternativo,

em geral, não são capazes de controlar epidemias de doenças de plantas em curso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento I - Avaliação da severidade de podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve após pulverização com diferentes controles alternativos

Os dados de severidade da doença foram utilizados para cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

3.1.1 Área de estudo, montagem dos experimentos e tratamentos

O experimento em campo foi realizado na estação experimental do Câmpus de Desenvolvimento Tecnológico da UFLA, Ijaci-MG, em área de, aproximadamente, 0.05 hectare (21°14'16"S,45°08'00"W, altitude média de 918 m), realizando irrigações (gotejamento), pulverizações, capinas e desbrotas quando necessário. Foram realizados dois experimentos com suas respectivas repetições biológicas, divididos em parcelas de 20m x 25m, sendo as mudas necessárias da couve-manteiga (*Brassica oleracea* L, var. *acephala*), obtidas de uma casa comercial da região. As mudas foram plantadas numa área de 500 m², sendo o primeiro experimento conduzido sem a inoculação da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e o outro com a bactéria utilizando irrigação por aspersão durante 24 horas logo após da inoculação (Figura 1).

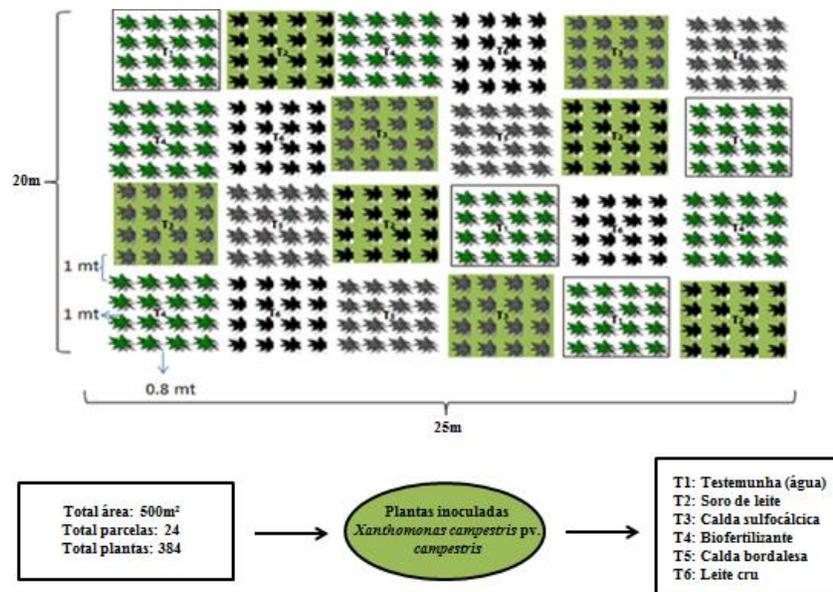


Figura 1 Delineamento experimental. T1-testemunha (água), T2-Soro de leite (10% v/v), T3-Calda sulfocálcica (100%), T4-biofertilizante (20% v/v), T5- Calda bordalesa (100%), T6-leite cru (10% v/v)



Figura 2 Delineamento experimental (estação experimental do Câmpus de Desenvolvimento Tecnológico da UFLA)

3.1.2 Obtenção e multiplicação do isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

O isolamento foi realizado, considerando folhas de couve, as quais apresentavam sintomas característicos, provocados pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, provenientes de hortas urbanas do município de Lavras/MG, de acordo com metodologia proposta por Mariano e Silveira (2000). No Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia, fragmentos das folhas, na área de transição tecido sadio e área lesionada, foram cortados, imergidos em álcool 50% por 30 seg e em água+hipoclorito de sódio (3:1) por 1 min, sendo enxaguados em água destilada. Após a desinfestação superficial, procedeu-se à maceração em solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada e, depois, com alça de platina, uma alíquota do macerado foi transferida para placas de Petri, contendo meio ágar-nutriente, distribuindo-se na forma de estrias compostas.

As placas foram etiquetadas, invertidas e incubadas a 25 °C em câmara de crescimento (tipo BOD) durante 72 horas. Em seguida desse período, foram feitas suspensões com duas concentrações, 5×10^6 UFC/ml e 5×10^8 UFC/ml, a absorbância a 600 nm foi ajustada para 0,3 que corresponde a uma concentração de, aproximadamente, 5×10^8 UFC/ml (QUEZADA-DUVAL; CAMARGO, 2004). Diluições seriadas foram feitas até atingir a concentração de 5×10^6 UFC/ml; Posteriormente, as suspensões foram pulverizadas com os produtos alternativos até o ponto de escorrimento, utilizando-se uma bomba costal, sendo inoculadas em diferentes plantas sadias de couve em casa de vegetação, obtendo sintomas da doença, após 72 horas, na concentração de 5×10^6 UFC/ml. As inoculações no campo foram feitas na superfície abaxial, mediante atomização com bomba costal e com 24h de molhamento contínuo para garantir a penetração da bactéria.

3.1.3 Obtenção e preparação dos produtos alternativos

Os derivados lácteos foram obtidos em um fornecedor de laticínios da cidade e congelados imediatamente a -20°C até uso. A concentração utilizada foi de 10% v/v.

O biofertilizante foi obtido, conforme Santos (1992) e consiste em fermentar por trinta dias, no sistema fechado com ausência de oxigênio, uma mistura de esterco fresco de bovino, preferencialmente leitero, água na proporção de 50% (v/v) e um quilograma de melaço. Para se obter um sistema anaeróbio, deixa-se um espaço vazio de 15 a 20 cm no seu interior, fecha-se hermeticamente e adapta-se uma mangueira à tampa, mergulhando-se a outra extremidade num recipiente com água para a saída de gases. A concentração utilizada foi de 20% (v/v).

Para a preparação da calda bordalesa, utilizaram -se 20 gramas de sulfato de cobre, 20 gramas de cal virgem em 2 litros de água para cada uma das aplicações feitas. A cal virgem, inicialmente, foi apagada (hidratada) lentamente, adicionando-se pequenas quantidades de água até completar o volume para 1 litro de água no recipiente A. Dissolveu-se o sulfato de cobre no recipiente B e completou-se o volume para 1 litro de água, as duas suspensões foram misturadas em um terceiro recipiente (C), sobre constante agitação, completando-se o volume com água até 2 litros finais, obtendo uma calda 1:1.

O PH final da calda deve ser neutro ou ligeiramente alcalino. Determinou-se o PH com um phmetro digital. A coloração final de uma boa preparação deve ser azul celeste.

Para a preparação da calda sulfocálcica, utilizaram -se 400 gramas de enxofre, 200 gramas de cal virgem em 2 litros de água para cada uma das aplicações feitas. Inicialmente, foi preparada uma pasta com as 400 gramas de enxofre em um pouco de água; a pasta de enxofre foi colocada em um recipiente

(panela) e adicionando-se 1 litro de água, levou-se ao fogo. Posteriormente, acrescentou-se a cal virgem e deixou-se em ebulição durante 1 hora com agitação. Durante a ebulição, adicionou-se água para obtenção de um volume final de 2 litros. Após atingir uma cor vermelha, finalmente, apagou-se o fogo e esperou esfriar; coou-se com um de um pano.

A densidade final foi medida por meio de um densímetro até a diluição desejada. A calda apresentou densidade de 27 a 33 °Bé (Graus Baumé). A concentração recomendada para hortaliças é de 0,3 °Bé.

3.1.4 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido via sistema orgânico, em delineamento de blocos casualizados (DBC), com 6 tratamentos e 4 repetições. Para condução do experimento, uma área de, aproximadamente, 500 m² foi preparada para receber as mudas da referida cultura. A parcela consistiu de quatro fileiras simples com 4,0 metros (m) de comprimento, distanciadas 1,0 m entre si e 1,0 m entre plantas (Figura. 1). Deste modo a parcela compreendeu uma área de 16 m² com 16 plantas, sendo definidas, como área útil, quatro plantas centrais, mantidas sem vegetação espontânea uma faixa de 1,0 m entre as parcelas, a fim de minimizar o “efeito corredor ecológico”. As plantas foram adubadas com 20 gramas/planta de NPK em proporção 8%, 24%, 4%, respectivamente.

No estágio inicial de desenvolvimento da cultura, aproximadamente, os 15 primeiros dias, após o transplante, (DAT), foram realizadas em todos os tratamentos capina manual da vegetação espontânea com enxada, tendo em vista que a competição pode impedir o estabelecimento das plantas, podendo tornar inviável a realização do trabalho. A partir de então, foi iniciada a aplicação dos tratamentos, como tratamentos preventivos.

As aplicações dos tratamentos foram realizadas, a cada 15 dias, a partir dos 35 dias após o transplante, totalizando 3 aplicações.

A inoculação artificial do patógeno foi feita 8 dias após a primeira aplicação dos tratamentos.

A severidade da doença foi monitorada a cada 5 dias, com base no surgimento dos primeiros sintomas/sinais da doença, totalizando 3 avaliações nas quatro plantas centrais ou área útil, estimada com o auxílio de escala diagramática de acordo com Vigo-Schultz et al. (2006), cujos níveis de doença eram 3, 6, 10, 19, 36 e 69% de área foliar lesionada. Os dados de severidade foram usados para cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), pela equação de Shaner e Finney (1977), e os dados de produção, ambos foram submetidos à análise de variância pelo teste de F. Foi avaliada a correlação entre a AACPD/porcentagem de controle da doença e a produção. As diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

Finalmente, foram coletadas amostras da área útil de cada uma das parcelas, as amostras passaram pelo processo de pesagem, para medir a produtividade de folha umida e foram armazenadas em refrigeração, para posterior análise da atividade antioxidante, fenóis totais, composição centesimal e análise microbiológica.

3.1.5 Dados meteorológicos

Obtiveram-se os valores de precipitação, umidade relativa, temperatura máxima, média e mínima, durante a condução dos experimentos, da estação meteorológica principal de Hortiagro, distante, aproximadamente, 200 m do local dos experimentos.

3.1.6 Determinação da atividade antioxidante

A metodologia foi baseada na extinção da absorção do radical 2,2 – difenil-1-picril hidrazil (DPPH 60 μ M). A análise foi realizada, segundo Rufino et al. (2007), com algumas adaptações em relação ao cálculo, em que se calculou a quantidade em gramas de DPPH/grama da amostra de couve, de acordo com a equação da reta obtida da curva padrão, com as concentrações de DPPH, que variaram de 0 a 60(μ M), calculando-se o percentual de sequestro do radical DPPH conforme o controle.

3.1.7 Determinação de compostos fenólicos

Para a quantificação estimada de compostos com capacidade redutora, dentre os quais os compostos fenólicos, presentes nas frações da amostra de couve, foi empregado o método espectrofotométrico (760 nm), utilizando o método colorimétrico de Folin-Dennis que tem como princípio a redução de fosfotungstato-fosfomolibdato em solução alcalina pelos compostos benzênicos polihidroxilados, formando o azul de molibidênio que será mais intenso quanto maior o número de hidroxilas presentes.

3.2 Composição centesimal

A avaliação de composição centesimal da couve (umidade, extrato etéreo, proteína bruta, fibra bruta e fração cinza) foi feita mediante metodologias da Aoac (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1998).

3.2.1 Determinação de umidade

A umidade foi determinada, segundo a técnica gravimétrica, em que foi empregado o calor em estufa ventilada à temperatura de 105°C, até a obtenção de peso constante da couve, segundo método da Aoac (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1998).

3.2.2 Determinação de extrato etéreo

A determinação do extrato etéreo ocorreu por extração com solvente orgânico (éter etílico), com o auxílio de um aparelho extrator do tipo Soxhlet, segundo método da Aoac (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1998).

3.2.3 Determinação de proteína bruta

Foi feita por meio do teor de nitrogênio por destilação, em aparelho de Microkjedahl (semimicro), usando o fator 6, 25, procedido do cálculo do teor de proteína bruta, conforme procedimento da Aoac (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1998).

3.2.4 Determinação de fibra bruta

A determinação de fibra bruta foi realizada por hidrólise ácida, pelo método gravimétrico, segundo o método descrito por (VON KAMER; VAN GINKEL, 1952).

3.2.5 Determinação da fração cinza

Determinou-se a fração cinza, gravimetricamente, avaliando a perda de peso do material submetido ao aquecimento em mufla a 550°-660°C Aoac (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1998).

3.3 Experimento II - Atividade de enzimas ligadas à proteção de plantas de couve após pulverização com diferentes controladores alternativos

Foram avaliadas diferentes enzimas associadas aos mecanismos de defesa da planta (POX, CAT e PAL), como também a quantificação de compostos fenólicos totais e lignina.

3.3.1 Delineamento experimental

O Experimento foi conduzido em casa de vegetação, as plantas de couve-manteiga (*Brassica oleracea* L, var. *acephala*), com 35 dias de transplante e adubadas com 20 gramas/planta de fertilizante NPK em proporção 8%, 24% e 4%. Foram pulverizadas com T1-soro de leite (10% v/v), T2-biofertilizante (20% v/v) T3- testemunha (água) e, T4-Bactéria Xcc. A inoculação com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ocorreu 5 dias (120h), depois da aplicação dos produtos; foram utilizadas sacolas de 40x80cm, para fazer camara úmida, em cada uma das plantas, garantindo o desenvolvimento da bactéria. O material vegetal, para as análises enzimáticas, foi coletado nos tempos 0, 24, 48, 96, 120, 144, 168 e 210 horas após aplicação dos tratamentos. Foram coletados o primeiro e o segundo par de folhas, as quais foram armazenadas em papel alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio (N₂)

líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80°C para análise posterior.

3.3.2 Obtenção e multiplicação do isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

O isolamento foi feito como o experimento I.

3.3.3 Análise da atividade enzimática

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas POX, CAT, e PAL, amostras de 200 mg de tecido foliar foram maceradas com N_2 líquido em almofariz, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/p) até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8; EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C , sendo os sobrenadantes utilizados para as análises enzimáticas (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

3.3.3.1 Peroxidase de guaiacol

A atividade POX foi determinada pela oxidação do guaiacol, de acordo com a metodologia de Urbanek, Kuzniakgebarowska e Herka (1991). Adicionaram-se 40 μL do extrato enzimático, ajustado para 200 μL de solução, contendo fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, guaiacol 7,5 mM e peróxido de hidrogênio 18,75mM. Após a incubação a 30°C , por 2 minutos, a absorbância foi medida a 480 nm. O coeficiente de extinção molar de $1,235 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi

usado para calcular a atividade enzimática da POX (CHANCE; MAEHLEY, 1995a).

3.3.3.2 Catalase

A CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 3 minutos, a 25°C. Adicionaram-se 10 µL do extrato enzimático em tampão de incubação, contendo fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, peróxido de hidrogênio 12,5 mM e água, ajustado para 200µL de solução final. O coeficiente de extinção molar de $18M^{-1} cm^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da CAT (HAVIR; MCHALE, 1987).

3.3.3.3 Fenilalanina amônia-liase

Para a determinação da PAL, o tecido foliar foi macerado conforme efetuado para as demais enzimas. Para cada grama de pó macerado, adicionaram-se 3mL do tampão de extração fosfato de sódio 50mM, pH 6,5, acrescido 1mM PMSF e 1% PVP. A solução foi centrifugada a 13000 g, por 25 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. A atividade da PAL foi determinada conforme metodologia descrita por Zucker (1965). Adicionaram-se 10µL do extrato enzimático ajustado para 200µL de solução, contendo Tris-HCL 140 mM, pH 8,8, fenilalanina 50mM. Depois da incubação a 37°C, por 20 minutos, a absorbância foi medida a 280 nm. O coeficiente de extinção molar $5000 mM^{-1} cm^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da PAL.

3.3.4 Preparo de tecidos foliares para a avaliação de lignina solúvel e de fenóis solúveis totais

Os tecidos vegetais foliares foram coletados nos tempos 0, 24, 48, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após aplicação dos tratamentos. Os triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 24 horas. Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para determinação de lignina solúvel como descrito a seguir.

3.3.4.1 Determinação de lignina solúvel

Foram adicionados ao resíduo sólido, 1,5 mL de metanol a 80%, homogeneizado e centrifugado, a 12.000 g, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco, a 65°C, por 15 horas. Posteriormente, acrescentaram-se 1,5mL de solução de ácido tioglicólico: HCl 2M (1:10). Em seguida, agitaram-se suavemente os microtubos, para hidratar o resíduo e esses foram colocados em banho-maria em fervura por 4 horas.

Depois, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5mL de água ultrapura e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. A

mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado (37%). A suspensão obtida foi mantida em câmara fria (4°C), por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico.

A seguir, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 2,0 mL de NaOH 0,5 M. Uma alíquota de 20 µL da suspensão foi transferida para microplacas, onde se completou o volume para 200µL de NaOH 0,5M.

A absorbância dessa solução foi determinada em espectrofotômetro EIA compatível, a 280 nm e os valores calculados, com base na curva de lignina e expressos em µg de lignina solúvel por miligrama de massa seca (DOSTER; BOSTOCK, 1988).

3.3.4.2 Determinação de fenóis solúveis totais

Em microplacas, alíquotas de 15 µL do extrato metanólico foram misturadas a 15 µL de metanol 80% e a 30 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N, por 5 minutos, homogeneizadas com 30 µL de Na₂CO₃ 1 M, por 10 minutos e diluídas com 110 µL de água destilada, à temperatura ambiente, por uma hora.

Os valores de absorbância dessa reação foram determinados, a 725 nm, em espectrofotômetro EIA compatível e calculados com base em curva de ácido clorogênico. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente µg de ácido clorogênico por miligrama de massa seca (SPANOS; WROLSTAD, 1990).

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com 4 tratamentos, 3 repetições e 2 plantas por repetição para cada tempo de

coleta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da severidade de podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve após pulverização com diferentes controles alternativos

Os dados de severidade da doença foram utilizados para cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)

Tabela 1 Severidade da podridão negra aos 5, 10 e 15 dias após inoculação

TRATAMENTOS	Dias após inoculação		
	5 dias	10 dias	15 dias
Testemunha (água)	3.75a	18.03a	30.06a
Soro de leite	1.69d	5.60d	18.31c
Calda sulfocalcica	3b	8.56c	22.91b
Biofertilizante	0.56e	3.59e	13.19d
Calda bordalesa	2.34c	8.75c	19.38c
Leite cru	3.28b	9.97b	19.13c
GL	5	5	5
F	10,5849	43,9902	4,5992
P	0,0002	0,0000002	0.0096

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

Na avaliação da severidade da doença, os efeitos dos experimentos foi significativo ($P \leq 0.05$) e foram tratados de forma separada (tabela 1 e 2). Também foi significativo ($P \leq 0.05$) o efeito dos períodos avaliados e o fator tratamento foi desdobrado para cada período avaliado.

Para ambos os experimentos, foi observado que para todos os períodos o tratamento com biofertilizante foi aquele que proporcionou a maior redução na severidade da doença. Um padrão semelhante de redução de doença foi observado para o soro de leite que foi inferior ao biofertilizante mas superior ou

semelhante ao tratamento calda bordalesa, considerada a testemunha positiva. Por sua vez, o leite cru teve eficiência semelhante à calda bordalesa, com exceção do primeiro experimento aos 5 e 10 dias em que foi inferior à testemunha positiva mas a severidade da doença para este tratamento foi inferior à testemunha água.

Em relação à testemunha positiva, a calda bordalesa proporcionou proteção de couve contra a podridão negra, mas a calda sulfocálcica proporcionou a menor redução no primeiro experimento (tabela 1) ou até aumentou a doença, comparado à testemunha no experimento 2 (tabela 2).

O controle de doenças com os biofertilizantes pode ser tanto em razão da presença de metabólitos, produzidos pelos microorganismos presentes no biofertilizante, como pela sua ação direta sobre o patógeno e sobre o hospedeiro ativando mecanismos de resistência (REUVENI; AGAPOV; REUVENI, 1995). Bettiol, Tratch e Galvão (1997) verificaram a presença de diferentes espécies de fungos filamentosos, leveduriformes e bactérias, entre elas *Bacillus* spp. Santos (1992) identificou bactérias que apresentavam inibição na germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, no crescimento de células de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e de *Ralstonia solanacearum*.

Como a comunidade de microorganismos no biofertilizante é rica e diversa, todos os mecanismos de ação de um microrganismo sobre outro (antibiose, competição e parasitismo), ocorrem simultaneamente. Entretanto, é difícil quantificar a ação de cada mecanismo e, o mais importante é, justamente, a ação conjunta desses mecanismos. Soma-se a isso a capacidade dos microorganismos ativarem mecanismos de resistência quando aplicados nas plantas.

Tabela 2 Severidade da podridão negra aos 5, 10 e 15 dias após inoculação

TRATAMENTOS	Dias após inoculação		
	5 dias	10 dias	15 dias
Testemunha (água)	2,34b	12,74b	28,02b
Soro de leite	1,96c	11,62c	23,84c
Calda sulfocalcica	2,80a	17,46a	31,87a
Biofertilizante	0,74d	3,74e	15,46d
Calda bordalesa	2,34b	10,65c	22,40c
Leite cru	2,25b	8,84d	21,37c
GL	5	5	5
F	9,0469	6,3145	2,7847
P	0,0004	0,0024	0,0500

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

No caso dos produtos lácteos, leite cru e soro de leite, ambos também reduziram o progresso da doença, essa eficiência já havia sido comprovada para o controle de oídio, os produtos lácteos possuem na sua composição importantes nutrientes que promovem o acúmulo potencial de população microbiana na superfície foliar, sugerindo que a lactose provavelmente desempenha um papel relevante na estimulação da microbiota do filoplano. (CRISP et al., 2004), outras proteínas de importância presentes no soro de leite como lactoferrina e lactoperoxidase podem controlar o oídio. (CRISP et al., 2006.; RAVENSBERG et al., 2006). Bettioli e Astiarraga, (1998) pela primeira comprovaram sua eficiência para o controle de uma doença bacteriana.

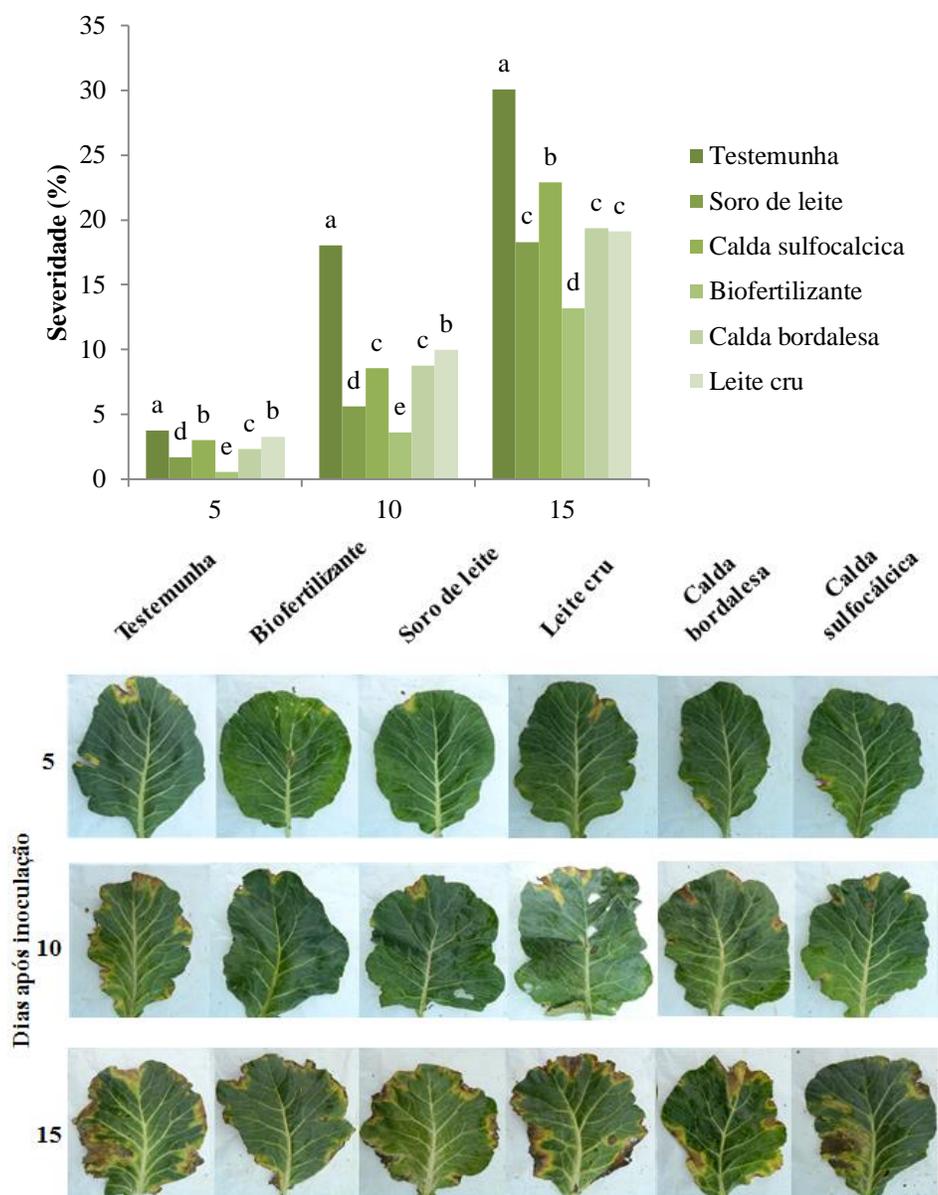


Figura 3 Severidade da podridão negra ao longo do tempo após inoculação

As caldas bordalesa e sulfocálcica, proporcionaram as menores proteções das plantas, ou, como no caso da calda sulfocálcica, até aumentaram a doença. A hipótese de que as pressões ambientais podem interferir na eficácia dos produtos, lavando o produto, exercendo pressões mais seletivas sobre a microflora epífita (OTESSEN et al., 2014).

O aumento da doença proporcionado pela calda sulfocálcica pode ser atribuída à menor eficiência ao patógeno alvo, mas redução significativa da microbiota do filoplano, criando um vácuo biológico que favoreceu o desenvolvimento do patógeno que resultaram na maior severidade da doença quando as condições ambientais lhe foram mais favoráveis (MEDEIROS, 2012), como observado para o segundo experimento (Figura 4).

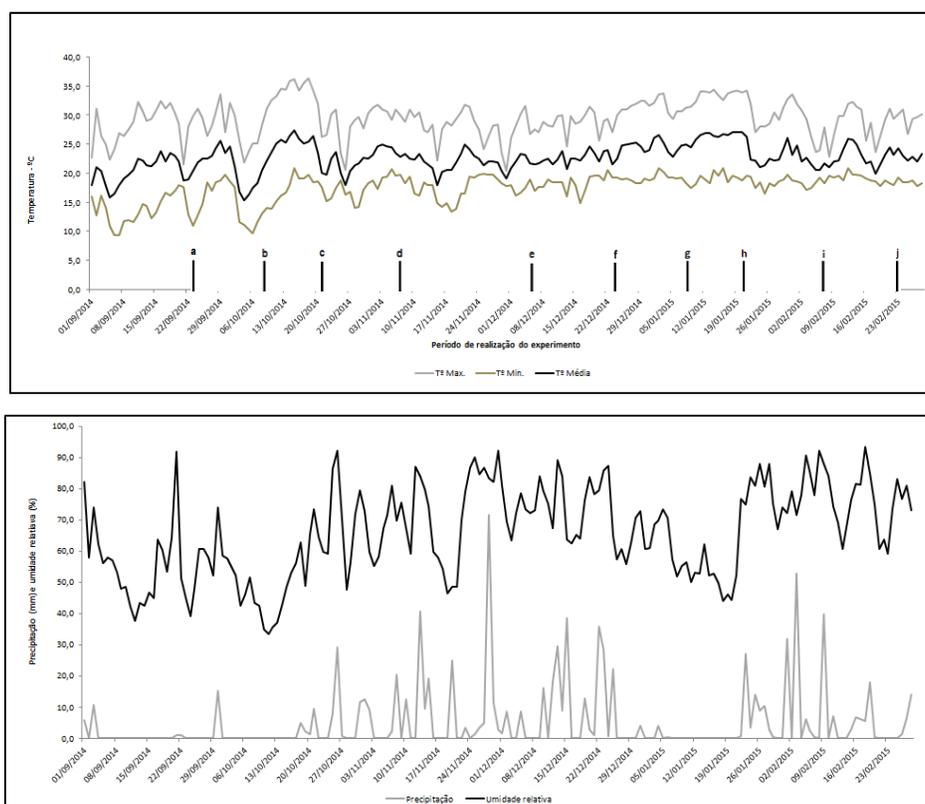


Figura 4 Precipitação, umidade relativa e temperatura durante o período de condução dos experimentos, com letras mostrando os períodos de aplicação dos tratamentos (a: 1º aplicação, exp. 1*, b: 2º aplicação, exp. 1* e 1º aplicação, exp. 2*, c: 3º aplicação, exp. 1*, 2º aplicação, exp. 2*, d: 3º aplicação exp. 2*, e: 1º aplicação, exp)

4.1.1 Análise centesimal

Os resultados da composição centesimal dos experimentos 1 e 2 (sem a bactéria), em base úmida das amostras em estudo (tabela 3).

No experimento 1, em relação ao teor de umidade, os tratamentos com o soro de leite, calda sulfocálcica e biofertilizante apresentaram variação significativa comparados com a testemunha. Enquanto a fibra bruta, nutriente que exerce várias funções benéficas ao organismo humano e aos vegetais, o teor

com o biofertilizante e calda bordalesa apresentaram diferenças significativas em relação aos demais tratamentos. Os valores encontrados foram próximos aos teores de fibra descritos em tabelas para alimentos (FRANCO, 2005), sugerindo a utilização desses vegetais como fonte de fibra na dieta alimentar para o auxílio na regularização das funções intestinais.

O teor de proteína dos tratamentos com o biofertilizante e leite cru em relação à testemunha evidenciaram diferenças significativas. Vilas-Boas (1999) relatou que o teor médio de proteínas dos frutos e hortaliças está em torno de 1% e 2%, respectivamente. No presente trabalho, os resultados não condizem com estes valores, conforme foi verificado na Tabela 3 (experimentos 1 e 2), apresentando teores maiores de proteína do que 2g/100 g de vegetal fresco. Costa et al. (2003) encontraram teores de proteínas que variaram em torno de 3,9% nas folhas de couve, valor próximo aos encontrados neste trabalho (Tabela 3).

Tabela 3 Composição centesimal, fenóis totais e DPPH dos experimentos 1 e 2 sem o patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*

Tratamento	Experimento 1					
	Fenóis	DPPH	Extrato etéreo	Umidade	Fibra bruta	Proteína bruta
Água	657b	69d	3,2 ^{ms}	20.2a	12.8b	5.0a
Soro de leite	741a	77c	3,2	16.0bc	13.2b	4.8ab
Calda sulfocalcica	658b	66e	3,7	14.8bc	14.4ab	5.0a
Biofertilizante	696ab	87a	3,8	13.0c	16.6a	4.3c
Calda bordalesa	707ab	59f	4,2	17.8ab	16.1a	5.0a
Leite cru	723a	80b	3,9	16.4ab	15.3ab	4.5b
GL	5	5	5	5	5	5
P	0,0018	<0.00001	0,1406	0,0001	0,001	<0.00001
CV	3,9	1,3	15,6	4,8	8,1	2,4

Tratamento	Experimento 2					
	Fenóis	DPPH	Extrato etéreo	Umidade	Fibra bruta	Proteína bruta
Água	533c	68c	2.5d	19.2a	14.2ab	4.8b
Soro de leite	531c	64d	2.6cd	15.5bc	13.4b	4.6c
Calda sulfocalcica	622b	87a	2.8bcd	14.8bc	14.7ab	4.8b
Biofertilizante	546c	65d	3.4ab	13.6c	14.4ab	4.2d
Calda bordalesa	558c	62e	3.7a	19.3a	15.2ab	5.0a
Leite cru	734a	84b	3.3abc	16.9b	15.8a	4.5c
GL	5	5	5	5	5	5
P	<0.00001	<0.00001	0,0003	<0.00001	0,0333	<0.00001
CV	0,3	0,2	10,2	6,1	6,6	1,5

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

No experimento 2, o teor de umidade com a calda bordalesa não difere, estatisticamente, com a testemunha, os demais tratamentos apresentaram variação significativa em relação à testemunha. O teor de lipídeos nos vegetais analisados (Extrato etéreo) apresentou diferenças significativas nos tratamentos com o biofertilizante, calda bordalesa e o soro de leite. Segundo Vilas-Boas (1999), os lipídios compreendem menos de 3% da composição da maioria dos frutos e hortaliças.

Como foi verificado na tabela 3, o teor de fibras na couve apresentou diferença significativa entre os tratamentos soro de leite e leite cru, mas não com a testemunha. A importância da utilização de fibras na dieta alimentar decorre do crescente número de enfermidades ocasionadas por sua deficiência. No

presente trabalho, encontrou-se teor elevado de fibra bruta em todos os tratamentos estudados, atingindo até 16,63% da DRI (DIETARY REFERENCE INTAKES, 2004).

4.1.2 Fenóis totais e DPPH

Com base nos dados da tabela 3 do experimento 1, evidencia-se que o(s) composto(s) ativo(s) dos extratos atua(m) como doador de hidrogênio ao radical, entretanto esta ação é diferenciada entre todos os tratamentos. Os melhores ou mais eficazes em sequestrar o radical livre foram o tratamento com o biofertilizante cujo percentual de inibição, foi superior a 84%, seguida pelo leite cru e o soro de leite, 80.37% e 77.43% respectivamente.

Melo et al. (2006) permitiram evidenciar que a maior capacidade de sequestrar o radical DPPH foi exibida pelo extrato metanólico da couve, seguida em ordem decrescente por o tomate, batata, couve-flor, repolho verde, espinafre e alface crespa todos com percentual de inibição superior a 70%.

Na relação entre o teor de fenólicos totais e à atividade antioxidante, apresentada na Figura 5 e 6, evidencia-se uma positiva correlação entre estas variáveis. Comportamento semelhante foi evidenciado por Kaur e Kapoor (2002), usando o reagente Folin Ciocalteau, para determinação de teor de fenólicos e o sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico para avaliar a atividade antioxidante de extrato etanólico de vegetais.

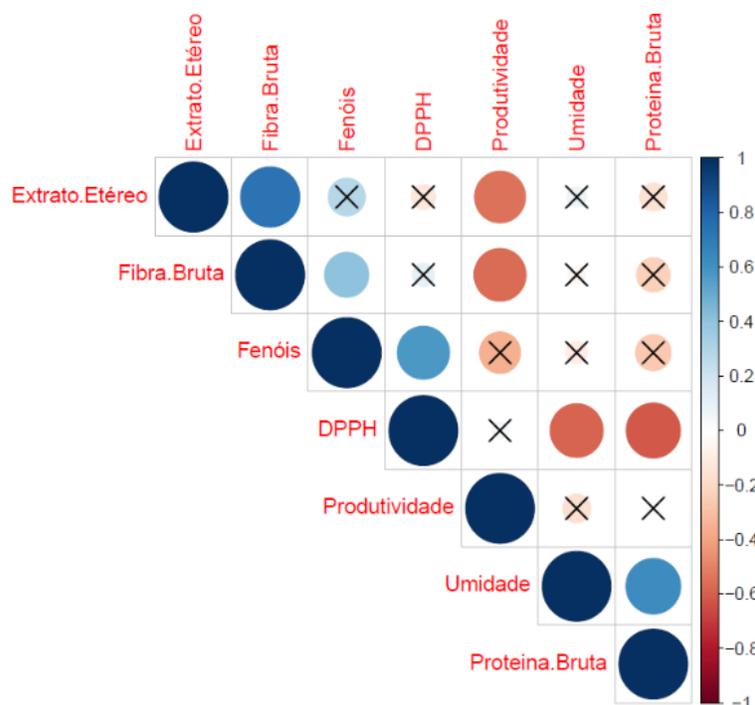


Figura 5 Correlação de Pearson ($P \leq 0.05$) das variáveis dos 2 experimentos sem o patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Vários autores têm demonstrado de forma conclusiva que existe uma forte relação positiva entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante de frutas e hortaliças. (ABIDILE et al., 2005; KAUR; KAPOOR, 2002; VELIOGLU et al., 1998; VISON et al., 1998), enquanto outros autores não têm evidenciado esta correlação (ISMAIL; MARJAN; FOONG, 2004; KAHKONEM et al., 1999). A composição química e a estrutura química do componente ativo do extrato são fatores importantes que influenciam a eficácia do antioxidante natural. A posição e o número de hidroxilas, presentes na molécula dos polifenóis, é um fator relevante para esta atividade. Acredita-se que a orto-dihidroilação contribui marcadamente para a atividade antioxidante do composto (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). Assim, a

atividade antioxidante de um extrato não pode ser explicada apenas com base em seu teor de fenólicos totais, a caracterização da estrutura do composto ativo, também, é necessária (HEINOMEN; LEHTONEN; HOPIA, 1998).

Evidencia-se, portanto, que a intensidade da atividade antioxidante das hortaliças deste estudo é diferente da relatada por outros autores. Vários fatores relacionados ao cultivo do vegetal, a exemplo das condições climáticas e edáficas, além das características genéticas da planta, influenciam o perfil de compostos fenólicos das hortaliças e, conseqüentemente, a sua ação antioxidante (MELO et al., 2006).

Os resultados da composição centesimal dos experimentos 3 e 4 (presença da bactéria), em base úmida das amostras em estudo, estão apresentados na tabela 4.

O teor de proteína do tratamento com o leite cru em relação à testemunha e entre si evidenciaram diferenças significativas nos dois experimentos (3 e 4).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos ressaltando o papel de proteínas e glicoproteínas nos mecanismos de resistência das plantas (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Os resultados do presente trabalho, por terem mostrado diferença significativa no nível de proteínas totais solúveis entre tratamentos e entre experimentos com e sem inoculação da bactéria, sugerem haver influência dos tratamentos como indutores de resistência.

Tabela 4 Composição centesimal, fenóis totais e DPPH dos experimentos 3 e 4 em presença do patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Tratamento	Experimento 3					
	Fenóis	DPPH	Extrato etéreo	Umidade	Fibra bruta	Proteína bruta
Água	329b	65d	4.1bc	10.9b	18.7ab	8.8cd
Soro de leite	328bc	77c	4.7abc	12.0ab	15.4c	8.8d
Calda sulfocalcica	293cd	80b	3.8c	12.8ab	18.1ab	8.8cd
Biofertilizante	499a	79b	5.2a	12.1ab	16.9bc	8.9c
Calda bordalesa	289d	76c	4.8ab	13.0a	20.5a	9.1b
Leite cru	368b	88a	4.6abc	12.1ab	19.4ab	9.2a
GL	5	5	5	5	5	5
P	<0.00001	<0.00001	0,001	0,0459	0,0001	<0.00001
CV	0,8	1,6	8,7	7,2	6,3	0,2

Tratamento	Experimento 4					
	Fenóis	DPPH	Extrato etéreo	Umidade	Fibra bruta	Proteína bruta
Água	594a	25a	4.0b	12.2 ^{ns}	16.9b	8.8b
Soro de leite	553b	33b	4.3ab	12,5	15.5b	8.8b
Calda sulfocalcica	484c	23b	4.7ab	13,8	18.3b	9.2b
Biofertilizante	473c	31b	5.2a	11,0	17.4b	9.3b
Calda bordalesa	559b	29a	4.6ab	11,5	22.1a	9.4b
Leite cru	581a	30b	4.7ab	14,4	22.0a	9.7a
GL	5	5	5	5	5	5
P	<0.00001	<0.00001	0,0012	0,4371	<0.00001	<0.00001
CV	0,60	1,2	6,87	1,78	6,71	2,1

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

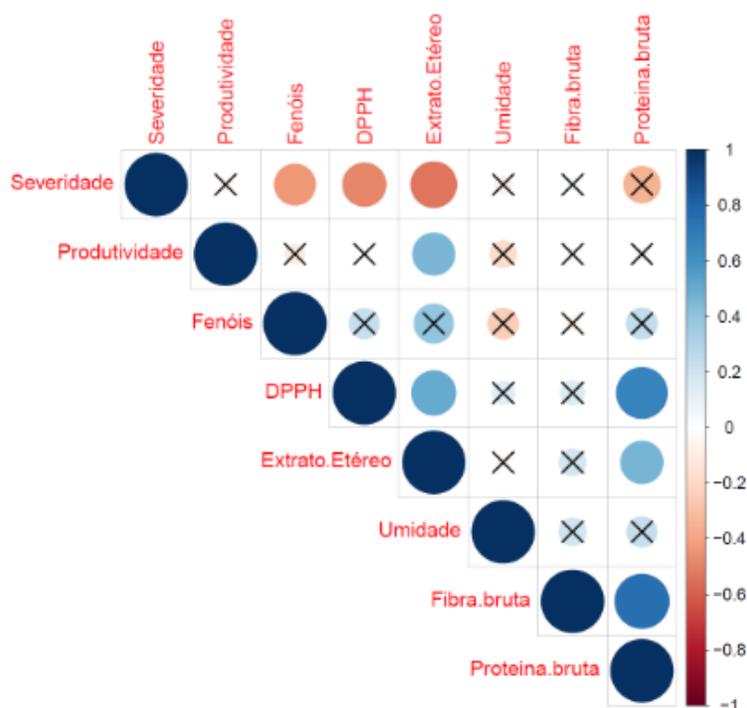


Figura 6 Correlação de Pearson ($P \leq 0.05$) das variáveis dos 2 experimentos sem o patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

4.2 Experimento II - Atividade de enzimas ligadas à proteção de plantas de couve após pulverização com diferentes controladores alternativos

Foram avaliadas diferentes enzimas associadas aos mecanismos de defesa da planta, como também a quantificação de compostos fenólicos totais e lignina.

4.2.1 Atividade das enzimas POX, PAL e CAT

Na avaliação da atividade da POX em plantas de couve, às 120 e 144 horas após aplicação (haa), houve um aumento na atividade desta enzima em

plantas pulverizadas com o biofertilizante que se diferiram de plantas pulverizadas com água e as inoculadas com *X. Campestris* pv. *campestris*. Às 168 horas, plantas pulverizadas com soro de leite apresentaram aumento da atividade da enzima, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5 Atividade das enzimas peroxidase (POX) nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento

Tratamentos	Peroxidase (POX)							
	T0	T24	T48	T96	T120	T144	T168	T216
	AE $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$							
Soro de leite	488 ^{ns}	760 ^{ns}	11517 ^{ns}	12042 ^{ns}	10607ab	1078b	5779a	1831 ^{ns}
Biofertilizante	471	865	9579	5164	14597a	17695a	196b	826
Testemunha (água)	406	764	1640	146	2557b	353b	178b	1391
Xcc	-	-	-	-	4186ab	204b	152b	230
GL	2	2	2	2	3	3	3	3
F	4,8	0,0	0,2	2,7	5,2	20,6	258,7	0,7
P	0,1	1,0	0,8	0,2	0,0	0,0	0,0	0,6
CV	1,1	7,6	20,6	27,8	8,0	9,3	2,8	18,8

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

Na análise da atividade da fenilalanina amoniliase (PAL), nenhum dos tratamentos proporcionou diferenças significativas na atividade desta enzima (Tabela 6).

Tabela 6 Atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento

Tratamentos	Fenilalanina amonialiase (PAL)							
	T0	T24	T48	T96	T120	T144	T168	T216
	AE $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$							
Soro de leite	9,6 ^{ns}	13,3 ^{ns}	8,4 ^{ns}	11,5 ^{ns}	4,1 ^{ns}	6,0 ^{ns}	3,3 ^{ns}	3,5 ^{ns}
Biofertilizante	10,4	12,5	7,5	8,1	7,4	6,4	3,0	4,4
Testemunha (água)	11,2	12,5	8,1	8,0	3,2	4,3	2,7	2,8
Xcc	-	-	-	-	5,0	6,0	3,8	3,1
GL	2	2	2	2	3	3	3	3
F	0,0	0,1	0,3	0,4	1,4	0,3	1,2	1,1
P	1,0	0,9	0,7	0,7	0,3	0,9	0,4	0,4
CV	11,9	6,5	12,9	14,8	54,8	55,0	22,6	34,8

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

Para a atividade da CAT, às 24 horas, plantas pulverizadas com o biofertilizante, sem inoculação do patógeno, apresentaram maior atividade desta enzima, diferindo dos demais tratamentos. Às 48 horas, plantas pulverizadas com o soro de leite apresentaram, também, um incremento na atividade da enzima em plantas sem o patógeno. Às 96 horas, tanto o soro de leite como o biofertilizante promoveu a atividade da enzima em relação à testemunha. Nos períodos de 120 e 144 horas, com a presença do patógeno, houve maior atividade enzimática nos tratamentos com o biofertilizante e soro de leite diferindo dos outros tratamentos. Finalmente, às 168 e 216 horas, os níveis da atividade decresceram e não foram significativos (Tabela 7).

Tabela 7 Atividade da enzima Catalase (CAT) nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento

Tratamentos	Catalase (CAT)							
	T0	T24	T48	T96	T120	T144	T168	T216
	AE $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$							
Soro de leite	5576 ^{ns}	4104b	2077a	2952a	2075ab	817b	1672 ^{ns}	897 ^{ns}
Biofertilizante	4821	7004a	446ab	1631a	2012a	3006a	592	534
Testemunha (água)	5214	5783b	1260b	678b	863ab	736bc	936	1476
Xcc	-	-	-	-	1404b	2422c	992	866
GL	2	2	2	2	3	3	3	3
F	0,0	20,3	9,2	36,8	5,4	116,2	2,9	3,6
P	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
CV	5,6	1,7	7,2	2,7	6,5	2,0	4,0	3,7

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.2.2 Determinação de lignina

Na determinação de lignina em plantas de couve, às 120 horas, com a presença da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, houve acúmulo de lignina nas plantas pulverizadas com o biofertilizante (Tabela 8).

Tabela 8 Determinação da lignina nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento

Tratamentos	Lignina							
	T0	T24	T48	T96	T120	T144	T168	T216
	AE $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$							
Soro de leite	12,8 ^{ns}	13,4 ^{ns}	12,1 ^{ns}	12,0 ^{ns}	13,9b	16,2 ^{ns}	10,9 ^{ns}	12,6 ^{ns}
Biofertilizante	14,1	12,8	11,7	11,7	17,5a	13,7	13,0	17,1
Testemunha (água)	13,6	13,4	12,3	11,2	12,9b	10,4	13,6	15,3
Xcc	-	-	-	-	14,1b	12,1	9,3	13,9
GL	2	2	2	2	3	3	3	3
F	0,3	0,2	0,2	0,1	3,5	3,9	3,4	3,4
P	0,8	0,9	0,8	0,9	0,0	0,1	0,1	0,1
CV	15,7	11,6	9,7	16,2	6,4	16,8	15,8	12,4

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.2.3 Determinação de fenóis totais

Ao analisar os fenóis totais, não se observou diferença estatística entre tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9 Determinação de fenóis totais nos diferentes períodos de tempo ao longo do experimento

Tratamentos	Fenóis totais							
	T0	T24	T48	T96	T120	T144	T168	T216
	AE $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$							
Soro de leite	6,1 ^{ns}	6,0 ^b	5,4 ^{ns}	6,4 ^{ns}	5,7 ^{ns}	6,2 ^{ns}	5,7 ^{ns}	5,8 ^{ns}
Biofertilizante	5,9	6,4 ^{ab}	6,0	6,3	6,0	5,9	5,4	5,4
Testemunha (água)	5,8	6,8 ^a	6,1	5,9	6,3	6,0	6,0	5,2
Xcc	-	-	-	-	6,4	5,9	5,7	5,4
GL	2	2	2	2	3	3	3	3
F	0,2	8,5	1,2	2,7	1,9	0,6	1,1	1,2
P	0,8	0,0	0,4	0,2	0,2	0,6	0,4	0,4
CV	9,2	3,5	10,1	5,4	6,5	6,5	6,7	7,8

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.2.4 Peroxidase (POX), Fenilalanina amônia-liase (PAL) e Catalase (CAT)

Nas etapas iniciais do experimento, (0-96 horas após aplicação), nos três tratamentos em estudo, não houve diferença significativa estatisticamente na ação das enzimas POX e PAL. No caso da CAT, o aumento da atividade enzimática foi evidente na presença do biofertilizante, no entanto, após inoculação da bactéria (120 horas), o tratamento biofertilizante mostrou ter maior ação ativando não só a síntese da POX e CAT, como também outros mecanismos de defesa. Isso pode ser atribuído à natureza do composto, muito provavelmente enriquecido com nutrientes minerais e microorganismos antagonistas que contribuíram na sua formação. A POX e a CAT parecem ter agido diretamente na diminuição de ROS (espécies reativas de oxigênio),

especificamente, na degradação do peróxido de hidrogênio H_2O_2 gerado, previamente, pela ação do peróxido dismutase (SOD). A presença da bactéria poderia ter originado a interrupção da cadeia de transportes de elétrons na fotossíntese originando OH^- e O_2^- , resultando o comprometimento do aparato fotossintético.

A infecção por patógenos avirulentos, presentes no biofertilizante, induz uma série de respostas de defesa, frequentemente, resultando no colapso localizado de células vegetais conhecidos como reação de hipersensibilidade (HR) (STAKAWICZ et al., 1995). Nessa reação, há a produção de intermediários reativos de oxigênio, conhecidos como ‘Reactive Oxygen Intermediates’ (ROI) ou ‘Reactive Oxygen Species’ (ROS), ou ainda ‘Espécies Ativas de Oxigênio’ (EAO’s), incluindo o O_2^- , H_2O_2 e OH^- (HEGEDUS; ERDEI; HORVÁTH, 2001).

O oxigênio molecular (O_2) é relativamente não reativo e não tóxico, em decorrência da estrutura estável dos elétrons na sua camada externa. Entretanto, alterações na distribuição dos elétrons podem provocar a sua ativação e influenciar os sistemas biológicos. As EAO’s podem ser geradas, dentro das plantas, como resultado da excitação ou um “leve toque” no elétron externo, formando oxigênio simples (1O_2) ou de uma sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular produzindo O_2^- , H_2O_2 e OH^- (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

A explosão oxidativa é uma das respostas mais rápidas de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno e a CAT é uma das enzimas importantes neste processo. Essa resposta corresponde à geração de espécies ativas de oxigênio (H_2O_2 , O_2^- e OH^-). São recentes os estudos de detecção e monitoramento destas espécies de oxigênio, em função da grande variedade de formas e intermediários, além da alta taxa de reatividade química envolvida nessas reações, dificultando os estudos. Existem evidências de que H_2O_2 está envolvido em muitos mecanismos de resistência da planta, atuando no reforço da

parede celular, pela ligação cruzada de proteínas estruturais ou fenólicos, formando uma barreira mecânica efetiva (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

No caso da fenilalanina amônia-liase PAL, nos três tratamentos em estudo, na etapa inicial (0-96 horas) quanto na etapa final (120-216 horas), não houve diferença estatística quando comparada a ação da PAL e ligninas. No entanto, a atividade sempre foi maior, depois da inoculação, comparado com as plantas não inoculadas. Esse fenômeno pode ser explicado, pois as plantas, sem comprometimento do metabolismo primário, garantem a formação de PAL para a transformação de carboidratos em ácido cumárico e, posteriormente, flavonoides e lignina proporcionando barreira na ação microbiana por meio do aumento na resistência da parede celular. Existe uma relação direta da ação da PAL com lignina, menores níveis de lignina atribuem-se a menores valores de PAL.

Portanto, no presente trabalho, observou-se que a pulverização do biofertilizante induziu respostas de defesa em plantas de couve, inoculadas ou não com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, a apresentarem maior atividade das enzimas relacionadas à limpeza de radicais livres (CAT e POX), sendo evidente maior expressão da catalase enzima utilizada para limpar as EAOs e proteger às células de dano oxidativo.

5 CONCLUSÕES

O melhor tratamento no controle da podridão negra foi o biofertilizante no controle preventivo da doença.

No presente estudo, verificou-se que o biofertilizante proporcionou um incremento na atividade das enzimas POX e CAT associadas aos mecanismos de defesa em plantas de couve.

As caldas sulfocálcica e bordalesa não foram eficientes no controle da doença.

Os derivados lácteos apresentaram eficiência no controle da doença, sendo alternativas importantes no manejo da podridão negra em couve.

Pelos resultados observados, indica-se que o biofertilizante, à base de esterco de gado e melação, é uma ótima alternativa no controle da podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

REFERÊNCIAS

- ABIDILLE, M. D. H. et al. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, London, v. 90, n. 4, p. 891-896, May 2005.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota sobre o uso de agrotóxicos em área urbana**. Brasília: ANVISA, 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4e11490047457fa48b44df3fbc4c6735/nota+t%C3%A9cnica+agro.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 21 maio 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists**. Washington: AOC, 1998. 1094 p.
- BETTIOL, W. Controle alternativo. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**, Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_23_299200692526.html>. Acesso em: 02 maio 2015.
- BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B. D. **Possibilidades de controle de oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) da abobrinha com leite cru**. Jaguariúna: Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental, 1998. 7 p.
- BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B. D.; LUIZ, A. J. B. Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. **Crop Protection**, London, v. 18, n. 8, p. 489-492, Sept. 1999.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Métodos alternativos usados com sucesso no Brasil para o controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 143- 157.
- BETTIOL, W.; TRATCH, R.; GALVÃO, J. A. H. **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes**. Jaguariúna: Embrapa, 1997. 22 p.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.

CENARGEM. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 2011. Disponível em: <<http://www.cenargem.embrapa.br/publica/trabalhos/bp093.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2015.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 2, p. 764-775, Oct. 1955a.

CHANCE, B.; MAEHLY, A. C. The assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 1, p. 764-775, 1955b.

COSTA, S. M. et al. Caracterización de acelga fresca de Santiago del Stero (Argentina). Comparación del contenido de nutrientes em hoja y tallo. Evaluación de los carotenóides presentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 33-37, jan./abr. 2003.

COUTINHO, M. N. Agricultura urbana: sociobiodiversidade e segurança alimentar e nutricional. In: FESTIVAL DE VERÃO DA UFMG, 3., 2009, Belo Horizonte. **Apostila...** Belo Horizonte: Editora da UFMG, 2009. p. 12-26.

CRISP, P.; SCOTT, E.; WICKS, T. Novel control of grapevine powdery mildew, *Uncinulla necator*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR ORGANIC FRUIT AND WINE GROWING, 2004, Stuttgart. **Proceedings...** Stuttgart: [s.n.], 2004.

CRISP, P., WICKS, T.J., TROUP, G., SCOTT, E.S. Mode of action of milk and whey in the control of grapevine powdery mildew. **Australasian Plant Pathology**, Australia. v 35, p. 487-493, 2006.

DAL SOGLIO, F. K. Manejo de doenças na perspectiva da transição agroecológica. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 1-16.

DIETARY REFERENCE INTAKES. **Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride and sulfate**. Washington: Academic Press, 2004. 640 p.

DOSTER, M. A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p. 473-477, Apr. 1988.

DOW, J. M. et al. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 19, p. 10995-11000, Sept. 2003.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 307p.

GUIMARÃES, A. Q. Educação popular e agricultura urbana: diálogos possíveis e desejados. In: FESTIVAL DE VERÃO DA UFMG, 3., 2009, Belo Horizonte. **Apostila...** Belo Horizonte: Editora da UFMG, 2009. p. 30-38.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HEGEDUS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 6, p. 1085-1093, May 2001.

HEINONEN, M.; LEHTONEN, P. J.; HOPIA, A. Antioxidative activity of berry and fruit wines and liquors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 1, p. 25-31, Jan. 1998.

HUGOUVIEUX, V.; BARBER, C. E.; DANIELS, M. J. Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, n. 6, p. 537-543, June 1998.

ISMAIL, A.; MARJAN; Z. M.; FOONG, C. W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, London, v. 87, n. 4, p. 581-586, Oct. 2004.

KAHKONEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, Oct. 1999.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 153-161, 2002.

LEITE, B. et al. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologias de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 119-157, 2001.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. et al. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa, 2014. 68 p. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/765605/1/CNPHDOCUMENTOS14DOENCASDAALFACEFL07824.pdf>>. Acesso em: 04 fev. 2014.

MARCOLINI, M. W.; CECÍLIO FILHO, A. B.; BARBOSA, J. C. Equações de regressão para a estimativa da área foliar de couve-folha. **Científica**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 192-198, 2005.

MARGIS-PINHEIRO, M. et al. Differential expression of bean chitinase genes by virus infection, chemical treatment and UV irradiation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, n. 4, p. 659-668, July 1993.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Isolamento de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p. 27-35.

MARTIN, A.; OUDWATER, N.; GÜNDEL, S. Metodologias para a análise de situação. **Revista de Agricultura Urbana**, Lima, n. 5, 2001.

MEDEIROS, F. H. V. **Mecanismos de ação e atividade de frações do leite no controle biológico do oídio da abobrinha**. Lavras: Editora da UFLA, 2005. 64 p.

MEDEIROS, F. H. V.; BETTIOL, W.; SOUZA, R.M.; ALVES, E.; PINTO, Z,V.; IOST, R. Microorganisms, application timing and fractions as players of the milk-mediated powdery mildew management. **Crop Protection**, Tehran, v. 40, p. 8-15, April 2012.

MELO, E. A. et al. Capacidade de hortaliças usualmente consumidas. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MINAS GERAIS. Lei nº 15.973 de 12 de janeiro de 2006. Dispõe sobre a política estadual de apoio à Agricultura Urbana e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**, Belo Horizonte, 13 jan. 2006.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL E COMBATE À FOME. **Agricultura urbana e periurbana pode ser caminho para acabar com a pobreza**. Brasília: MDS, 2011. Notícia. Disponível em: <<http://www.mds.gov.br/saladeimprensa/noticias/2011/fevereiro/agricultura-urbana-e-periurbana-pode-ser-caminho-para-acabar-com-a-pobreza>>. Acesso em: 14 fev. 2015.

MOUGEOT, L. J. A. Agricultura urbana: conceito e definição. **Revista de Agricultura Urbana**, Lima, n. 1, 2000.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, June 1981.

OTTESEN, A. R. et al. The impact of systemic and copper pesticide applications on the phyllosphere microflora of tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 95, n. 5, p. 1116-1125, Mar. 2014.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 417-453. 1995.

PROGRAMA DE HORTICULTURA URBANA E PERIURBANA. Divisão de Produção e Proteção Vegetal. **Viale delle terme di caracalla, Roma, Itália**. Rome: FAO, 2012. 20 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/015/i1610p/i1610p00.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

QUEZADA-DUVAL, A. M.; CAMARGO, L. E. A. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 80-86, jan./mar. 2004.

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

REUVENI, M.; AGAPOV, V.; REUVENI, R. Suppression of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by foliar sprays of phosphate and potassium salts. **Plant Pathology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 31-39, Feb. 1995.

RIBEIRO, M. T.; CARVALHO, A. C. Higiene de los equipos de ordeno y tanques de refrigeración, visando la calidad de la leche. In: MARTINS, C. E. et al. **Tecnologias para la producción de la leche en los trópicos**. Campinas: Embrapa, 2002. Cap. 15, p. 201-206.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 183, p. 56-59, 1995.

RUFINO, M. S. do M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa, 2007. (Comunicado Técnico, 2007).

SANTANDREU, A.; LOVO, I. C. **Panorama da agricultura urbana e periurbana no Brasil e diretrizes políticas para sua promoção**: identificação e caracterização de iniciativas de AUP em Regiões Metropolitanas Brasileiras. Belo Horizonte: MDS, 2007. 89 p. Disponível em: <<http://agriculturaurbana.org.br/sitio/textos/panorama%20AUP.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2015.

SANTOS, A. C. V. dos. **Biofertilizante líquido, o defensivo da natureza**. Niteroi: Emater, 1992. 16 p.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-milde wing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 317 p.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, July 1990.

STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 293 p.

STASKAWICZ, B. J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, London, v. 268, n. 5211, p. 661-67, May 1995.

STEINER, F. et al. Efeito do composto orgânico sobre a produção e acúmulo de nutrientes nas folhas de couve manteiga. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Rio Grande, v. 4, n. 2, p. 1886-1890, 2009.

URBANEK, H.; KUZNIAKGEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean-leaves by botrytis-cinerea polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VIGO-SCHULTZ, S. C. et al. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, out./dez. 2006.

VILAS BOAS, E. V. B. **Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de frutos**. Lavras: Editora da UFLA, 1999. 71 p.

VISON, J. A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 9, p. 3630-3634, Aug. 1998.

VON KAMER, S. B. de; VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 19, n. 4, p. 239-251, July/Aug. 1952.

WIT, J. P. et al. Integração de métodos físicos e biológicos para o controle de doenças e pragas em lírios e espatifilo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**, Embrapa: Jaguariuna, 2009. Cap. 22, p. 330-335.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 40, n. 5, p. 779-784, 1965.