

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

Hérnia das Crucíferas (*Plasmodiophora brassicae*) em Couve-Flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) e suas Relações com o Manejo do Solo no Município de Nova Friburgo, RJ

Aline da Silva Bhering

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS (*Plasmodiophora brassicae*) EM COUVE-
FLOR (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) E SUAS RELAÇÕES COM O
MANEJO DO SOLO NO MUNICÍPIO DE NOVA FRIBURGO, RJ**

ALINE DA SILVA BHERING

Sob a Orientação da Professora
Margarida Gorete Ferreira do Carmo

e Co-orientação do Professor
Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Abril de 2017

B575h Bhering, Aline da Silva , 1987-
Hérnia das crucíferas (Plasmodiophora brassicae) em
couve-flor (Brassica oleracea var. botrytis) e suas
relações com o manejo do solo no município de Nova
Friburgo, RJ / Aline da Silva Bhering. - 2017.
146 f.: il.

Orientador: Margarida Gorete Ferreira Do Carmo.
Coorientador: Nelson Moura Brasil do Amaral
Sobrinho.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em
Fitotecnia, 2017.

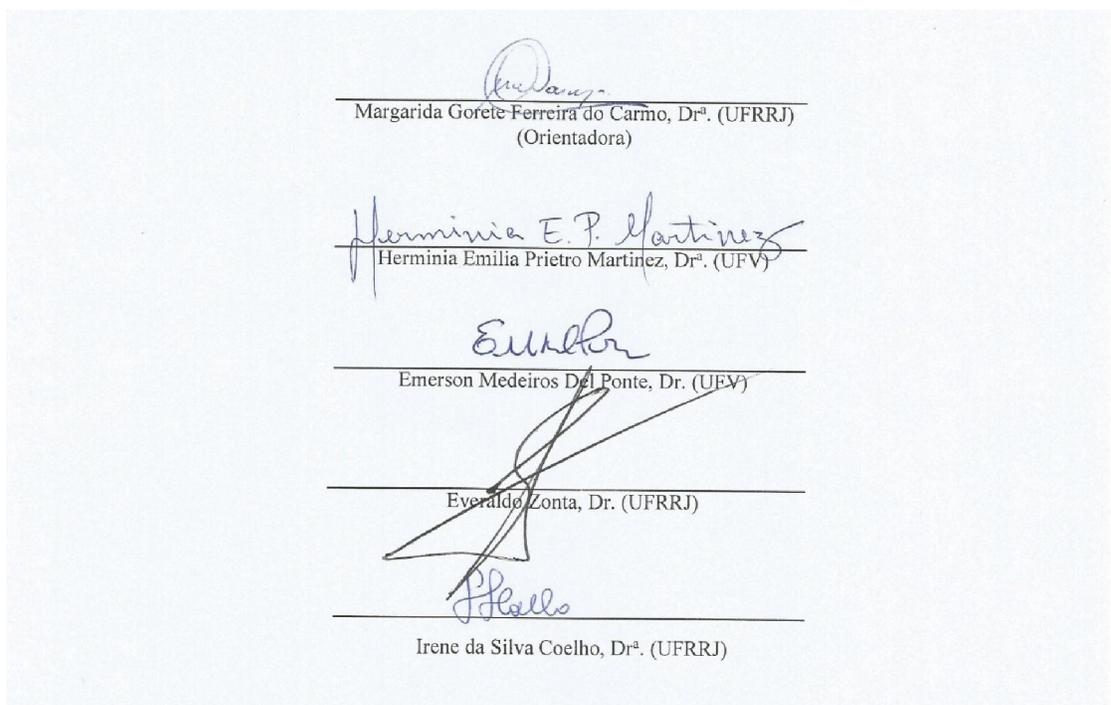
1. Patógeno de solo. 2. solos tropicais. 3. alumínio
. I. Do Carmo, Margarida Gorete Ferreira, 1963-,
orient. II. Sobrinho, Nelson Moura Brasil do Amaral ,
1956-, coorient. III Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Programa de pós-graduação em
Fitotecnia. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

ALINE DA SILVA BHERING

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal.

TESE APROVADA EM 09/05/2017.



“Peça a Deus que abençoe seus planos e eles darão certo.”
Provérbios, 4 (16:3)

*Ao Deus que guia meus passos,
Ofereço*

*Aos meus pais Shirlei e Moisés e aos meus irmãos, companheiros em todos os
momentos,*

Ao meu amado esposo Matheus, que com muita paciência e amor sempre me apoiou,

Dedico com carinho

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda sabedoria e toda bênção a mim concedida.
Aos meus pais, Shirlei e Moisés, por todo apoio, amor e confiança em mim depositado.
Aos meus irmãos Andressa e Igor, por todo carinho, respeito e confiança.
Ao meu esposo Matheus, por toda paciência, companheirismo, carinho e ajuda durante todo esse tempo. A ele toda minha gratidão pela dedicação.
Aos meus sogros, Geraldo e Maria, por acreditar em mim e me apoiar.
A minha orientadora, pelo apoio, crítica e ajuda durante todo esse tempo de trabalho. Muito obrigada pela contribuição no meu crescimento profissional.
Aos professores Everaldo Zonta e Nelson Moura Brasil que sempre me aconselharam e estiveram dispostos a me apoiar e me ensinar.
Ao Dr. Evandro Silva Costa e as meninas do laboratório, por toda disposição e ajuda.
À Dra. Irene pela atenção e dedicação.
À Dra. Hermínia pelo apoio e dedicação em meu trabalho.
À Drs. Erica Abreu, Samuel Passos e Bruno Carvalho pelo tempo dedicado aos dados da minha tese.
Ao Dr. Rafael Pimentel, pela ajuda e ensinamento.
Aos meus amigos, principalmente a Talita e Carlos, que estiveram comigo em todas as dificuldades e conquistas. Muito obrigada!
Aos estagiários: Ana Luiza, Kaoany, André, Paula, Caio e Maurilio por todo empenho.
As minhas companheiras Janiele e Ariana, e ao Prof. Mario Puiatti que sempre me motivaram a seguir em frente.
Aos funcionários da Horticultura por toda disposição e ajuda.
Aos agricultores, Carla e Aroldo, por conceder a área para experimento e pela ajuda.
Às associações de produtores de Nova Friburgo-RJ.
Aos meus familiares que de perto ou de longe torceram por mim, oraram e acreditaram na conquista.
À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao PPGF e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de cursar o doutorado.
À CAPES e à FAPERJ pela bolsa concedida.
A todas as pessoas que, mesmo não mencionadas aqui, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, a minha gratidão.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

Aline da Silva Bhering, filha de Moisés Lopes Bhering e Shirlei Aparecida da Silva Bhering, nasceu em 31 de maio de 1987 em São Paulo - SP.

Em 2006 iniciou o curso de agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde permaneceu por dois anos até se transferir para a Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde obteve o título de Engenheira Agrônoma, em julho de 2011.

Em agosto de 2011, iniciou o curso de pós-graduação em Fitotecnia em nível de mestrado, no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em 2013 ingressou no Doutorado, no Curso de pós-graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO GERAL

BHERING, ALINE DA SILVA. **Hérnia das crucíferas (*Plasmodiophora brassicae*) em couve-flor (*Brassica oleracea* var *botrytis*) e suas relações com manejo do solo e da cultura no município de Nova Friburgo, RJ.** 2017. 147F. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O município de Nova Friburgo destaca-se como grande produtor de hortaliças e de couve-flor. Produz duas a três safras de couve-flor por ano em áreas de acentuada declividade e sob práticas de manejo convencional e com cultivo intensivo ao longo do ano. A produtividade e qualidade de couve-flor, porém, vem sendo limitada pela ocorrência de hérnia das crucíferas, causada por *Plasmodiophora brassicae*, protozoário habitual do solo e fitoparasita obrigatório. O presente trabalho foi realizado na Microbacia de Barracão dos Mendes, em unidades de produção familiar com cultivo de couve-flor há mais de 30 anos. Teve como objetivos: 1) identificar as relações entre os atributos do solo a severidade da doença; 2) identificar as práticas de manejo adotadas e as suas relações com a ocorrência da hérnia das crucíferas e a diversidade microbiana; 3) avaliar o efeito da calagem na redução das perdas pela doença; e, 4) avaliar a relação entre teores de Al e o desenvolvimento da planta e do processo de infecção pelo patógeno. Constatou-se que, a acidez do solo e aplicação de grandes quantidades de cama-de-aviário “fresca” e os altos teores de Al³⁺ foram os atributos de solo que mais contribuíram para o aumento da severidade da doença e redução da produção de biomassa pelas plantas. A doença ocorre de forma generalizada na região, mas com variações quanto à severidade, e que este quadro resulta da não adoção de medidas de caráter preventivo e ou de estratégias básicas como a correção da acidez do solo. Os teores de matéria orgânica e de fósforo afetaram, positiva e negativamente, respectivamente, a diversidade bacteriana, mas sem ter uma relação direta com a ocorrência da doença. A aplicação de doses crescentes de calcário, até 4,0 t.ha⁻¹, resultou em ganhos significativos na produção de couve-flor, seja pela redução da severidade da hérnia das crucíferas, seja pelo aumento do volume do sistema radicular sadio. O alumínio reduziu o comprimento de parte aérea, a concentração e acúmulo de cálcio nas folhas e raízes. O alumínio ocasionou má formação da lamela média e danos na parede celular. O patógeno reduziu o comprimento de raiz e o volume de raiz sadia e aumentou a concentração de cálcio e as divisões celulares nas raízes.

Palavras-chave: Patógeno de solo, solos tropicais, alumínio.

GERAL ABSTRACT

BHERING, Aline da Silva. **Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*) and its relationship with management of soil in the municipality de Nova Friburgo, RJ.** 2017. 147f. Thesis (Doctor in Agronomy, Crop production). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The city of Nova Friburgo stands out as a major producer of vegetables and cauliflower. It produces two to three cauliflower crops per year in areas of steep declivity and under conventional and intensive cultivation practices throughout the year. The cauliflower productivity and quality, however, has been limited by the occurrence of cruciferous hernia, caused by *Plasmodiophora brassicae*, common protozoan of the soil and phytoparasite obligatory. The present study was carried out in the Barracão dos Mendes microbasin, in family production units with cauliflower cultivation for more than 30 years. It had as objectives: 1) To identify the relationships between soil taxes and the severity of the disease. 2) To identify the adopted management practices and to identify their relations with the occurrence of hernia of the crucifers; and 3) microbial diversity; 4) To evaluate the effect of liming on reducing disease losses and, 5) To evaluate the relationship between Al contents and the development of the plant and the process of infection by the pathogen. It was found that the soil acidity and the application of large quantities of uncomposted poultry manure, the high levels of Al³⁺ were the attributes that contributed the most to the increase of disease severity and reduction of biomass production plants. The disease occurs in a general way in the region, but with variations in severity, and that this situation results from the non-adoption of preventive measures and / or basic strategies such as the correction of soil acidity. The organic matter and phosphorus contents affected, positively and negatively, respectively, the bacterial diversity, but without having a direct relation with the occurrence of the disease. The application of increasing doses of limestone, up to 4.0 t.ha⁻¹, resulted in significant gains in cauliflower production, either by reducing the severity of clubroot or by increasing the volume of the healthy root system. The aluminum reduced the length of aerial part, the concentration and accumulation of calcium in the leaves and roots. Aluminum caused malformation of the middle lamella and damage to the cell wall. The pathogen reduced root length and healthy root volume and increased calcium concentration and cell divisions in roots.

Keys-word: Soil pathogen, tropical soils, aluminum.

ÍNDICE DE TABELAS

CAPITULO I

TABELA 1.	Variáveis dos atributos do solo, intensidade dos atributos da hérnia e desenvolvimento de atributos de plantas de couve-flor utilizados em análise multivariada e descritiva.....	10
TABELA 2.	Média, desvio padrão (DP) e valores mínimos e máximos da severidade da Hérnia das crucíferas, expressa pelas porcentagens de raízes sadias e raízes com hérnia; Número de esporos de <i>Plasmodiophora brassicae</i> no solo; peso seco total; E os pesos secos para a inflorescência, folhas, caules e raízes de plantas de couve-flor nos dois grupos de plantas formados por análise de agrupamento: Grupo 1 e Grupo 2 (G1 e G2).....	11
TABELA 3.	Média, desvio padrão (DP) e valores mínimos e máximos de atributos do solo nos dois grupos de plantas formados por análise de agrupamento, Grupo 1 e Grupo 2 (G1 e G2), das áreas amostradas para estudar a raiz do grupo na couve-flor.....	11

CAPITULO II

TABELA 4.	Número de amostras retiradas em cada propriedade.....	29
TABELA 5.	Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de pH e número de esporos no solo de cada comunidade.....	36
TABELA 6.	Severidade em escala de notas e índice de severidade da Hérnia das crucíferas, no cultivo de inverno de couve-flor, safra de 2013.....	39

CAPITULO III

TABELA 7.	Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de atributos químicos e microbiológicos do solo nos dois grupos, G1 e G2, das áreas amostradas para estudo da hérnia das crucíferas em couve-flor.....	57
TABELA 8.	Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de atributos físico nos dois grupos, G1 e G2, das áreas amostradas para estudo da hérnia das crucíferas em couve-flor.....	58
TABELA 9.	Médias, desvio padrão (DP) e valores mínimos e máximos de atributos relacionados à quantificação da intensidade da hérnia das crucíferas em plantas de couve-flor nos dois grupos, G1 e G2, identificados na análise de agrupamento.....	58

CAPITULO IV

TABELA 10.	Resultado da análise química do solo antes da aplicação dos tratamentos.....	69
------------	--	----

TABELA 11.	Valores médios de massa da matéria fresca total de raízes; volume total de raiz e volume de raiz sadia, observadas na híbrido Sharon e na cultivar Piracicaba.....	77
TABELA 12.	Valores médios de massa de matéria fresca de folha (MFF), de massa de matéria fresca de caule (MFC), de massa de matéria fresca de parte aérea (MFPA), de massa de matéria fresca total (MFT), observadas no híbrido Sharon e na cultivar Piracicaba.....	79
TABELA 13.	Valores médios de Macro e micronutrientes acumulados na inflorescência e acumulado na parte aérea de plantas de couve-flor das cultivares Sharon e Piracicaba Precoce.....	82

CAPITULO V

TABELA 14.	Efeito de pH e de concentração de Al na solução nutritiva, da inoculação com <i>Plasmodiophora brassicae</i> , e da interação entre estes, sobre a massa de matéria fresca e seca de folhas, caules e raízes de plantas de couve-flor, cultivar ‘Verona’, avaliada aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos, em solução hidropônica.....	97
TABELA 15.	Efeito de pH e de concentração de Al na solução nutritiva, da inoculação com <i>Plasmodiophora brassicae</i> , e da interação entre estes, sobre o comprimento de raiz e de parte aérea em plantas de couve-flor, cultivar ‘Verona’, avaliada aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos, em solução hidropônica.....	97
TABELA 16.	Efeito de pH e de concentração de Al na solução nutritiva, da inoculação com <i>Plasmodiophora brassicae</i> , e da interação entre estes sobre o volume de raízes, total, sadia e com hérnia, e porcentagem de raiz sadia e com hérnia em plantas de couve-flor, cultivar ‘Verona’, avaliada aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos, em solução hidropônica.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

FIGURA 1.	Análise de componente principal (biplot) em relação ao estudo de Hérnia das crucíferas em couve-flor.....	12
FIGURA 2.	Dendrograma relacionado à análise de agrupamento das amostras de solo e couve-flor com base nas características médias do solo estabelecidas pelo método de Ward e distância euclidiana.....	15
FIGURA 3.	Média padronizada de (A) atributos do solo; (B) intensidade da raiz com hérnia; (C) biomassa da raiz, inflorescência, caule, folha e total de couve-flor; e (D) N, K, Mg e Ca acumulados na inflorescência, caule, folha e raiz, bem como o alumínio acumulado na raiz da couve-flor nos dois grupos (G1 e G2) formados através de análise de agrupamento.....	16
FIGURA 4.	Para os grupos G1 e G2: quantidades médias de (A) cálcio, (B) magnésio, (C) potássio e (D) Nitrogênio acumulado nas raízes, inflorescências, caules e folhas, bem como as quantidades totais; (E) de alumínio acumulado nas raízes de plantas de couve-flor.....	18

CAPITULO II

FIGURA 5.	Mapa indicando os pontos de coletas das amostras (http://goto.arcgisonline.com/maps/World_Imagery). Fonte: Matos, 2017.....	29
FIGURA 6.	Bandejas com mudas de couve-flor depositadas diretamente em contato com o solo ao lado da área para onde as mudas serão transplantadas. Foto: Santos, C.A.2015.....	32
FIGURA 7.	Tipos de manejo adotados dos produtores de couve-flor. Dados obtidos em 16 unidades familiares de Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande no município de Nova Friburgo, RJ. Setembro de 2013.....	35
FIGURA 8.	Distribuição de frequência dos valores médios de pH _(água) de solos de três comunidades do município de Nova Friburgo-RJ, considerando 168 amostras coletadas na safra de inverno de 2013. Seropédica-RJ, 2016.....	37
FIGURA 9	Severidade estimada da hérnia das crucíferas considerando os valores observados de pH _(água) e o número de esporos de resistência de <i>P. brassicae</i> (Logaritmo) em amostras de solo coletadas em 16 propriedades de Nova Friburgo-RJ, na safra de inverno de 2013.....	38

CAPITULO III

FIGURA 10.	Análise de componente principal (biplot) das 168 amostras de plantas de couve-flor.	52
FIGURA 11.	Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante dos produtos de amplificação da região 16 S do rDNA de Bacterias do DNA total extraído de 17 amostras de solo cultivado com couve-flor, em Nova Friburgo, RJ. M = Marcador II (código: 315-06404 Nippon Gene).....	53
FIGURA 12.	Dendrograma de similaridade genética de populações bacterianas de 17 amostras de solos cultivado com couve-flor em Nova Friburgo, RJ, obtido pelo método de agrupamento UPGMA a partir dos dados gerados na eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)..	54
FIGURA 13.	Médias padronizadas dos atributos físico-químicos e microbiológicos dos solos e intensidade da hérnia das crucíferas, nos dois grupos (G1 e G2) formados pela análise de agrupamento.....	55
FIGURA 14.	Análise de componentes principais (Gráfico biplot) relativos ao estudo da relação entre a diversidade bacteriana, características físicas e químicas do solo e hérnia das crucíferas em couve flor: A: atributos do solo \times total de bandas; B: severidade da hérnia \times total de bandas.....	59

CAPITULO IV

FIGURA 15.	Temperatura (°C), máxima, média e mínima, e precipitação (mm) registrada no período de setembro de 2014 a março de 2015, desde a aplicação das doses de corretivo até a colheita da couve-flor. Nova Friburgo-RJ, 2014/2015.....	72
FIGURA 16.	A: Cálcio; B: Magnésio; C: Fósforo; D: Potássio; E: soma de bases; F: saturação por bases de acordo com as doses de corretivo após 90 dias da aplicação.....	74
FIGURA 17.	A: acidez potencial; B: pH; C: Saturação por Al; D: Alumínio de acordo com as doses de corretivo após 90 dias da aplicação.....	75
FIGURA 18.	Valores médios A: massa fresca de raiz; B: volume total de raízes e C: volume de raízes sadias, em duas cultivares de couve-flor, em função das doses de corretivo aplicado (calcário parcialmente calcinado com PRNT =104,5%).....	77
FIGURA 19.	Número de esporos de resistência de <i>Plasmodiophora brassicae</i> registrados nas diferentes parcelas (log número de esporos/g de solo).....	78
FIGURA 120.	Valores médios A: massa fresca de caule- MFC; B: massa fresca total - MFT, C: massa fresca de parte aérea - MFPA, em plantas das cultivares Sharon e Piracicaba Precoce em	

	função das doses de calcário (calcário parcialmente calcinado com PRNT =104,5%).	80
FIGURA 21.	Valores médios de A: massa fresca de inflorescência – MFI; B: diâmetro da inflorescência; C: produtividade por parcela e D: número de plantas normais, em função das doses de calcário (calcário parcialmente calcinado com PRNT =104,5%).....	81
 CAPITULO V		
FIGURA 22.	A: Visão geral do sistema de condução do experimento; B: Medição de pH no vaso.....	92
FIGURA 23.	Concentração de Cálcio na raiz em função do pH da solução hidropônica (A); Concentração de cálcio na raiz em função da concentração de Al na solução hidropônica (B); Concentração de Alumínio na raiz em função do pH da solução hidropônica (C); Concentração de alumínio na raiz em função da concentração de Al na solução hidropônica (D).....	100
FIGURA 24.	Concentração de Cálcio na folha em função do pH da solução hidropônica (A); Concentração de cálcio na folha em função da concentração de Al na solução hidropônica (B).....	100
FIGURA 25.	Cálcio acumulado na raiz em função da concentração de Al na solução hidropônica (A); alumínio acumulado na raiz em função da concentração de Al na solução hidropônica (B); Cálcio acumulado na folha em função da concentração de Al na solução hidropônica (C).....	101
FIGURA 26.	Micrografias óticas de cortes longitudinais da região da coifa de raízes de plântulas de couve –flor (<i>Brassicae oleraceae</i>) corados com azul de toluidina após terem sido mantidas em solução nutritiva com 60 uM.L ⁻¹ alumínio por 30 dias. Observa-se o excesso de núcleos (A; B; e C); paredes estão lisadas e células corticais hipertrofiadas (B); Núcleo extranumerário (C).....	103
FIGURA 27.	Micrografias óticas de cortes longitudinais da região da coifa de raízes de plântulas de couve–flor (<i>Brassicae oleraceae</i>) corados com azul de toluidina após terem sido mantidas em solução nutritiva com 60 uM.L ⁻¹ alumínio por 30 dias. Observa-se má formação da epiderme (A e B); espaços entre as células meristemáticas indicando a má/não formação da lamela média (C);coifa íntegra, sem espaços na lamela média e sem danos a parede celular em pH 6,3 e ausência de Al (D); Má formação da epiderme e morte da mesma na região de diferenciação, ocasionando aberturas e falta de proteção externa (E); Zona de transição mostrando a degeneração da parede celular da protoderme na região meristemática levando à não formação da epiderme na zona de alongamento(F).....	104

- FIGURA 28. Micrografias óticas de cortes transversais da região de absorção de raízes de plântulas de couve-flor (*Brassicae oleraceae*) corados com azul de toluidina após terem sido mantidas em solução nutritiva inoculada com *P. brassicae* por 30 dias. Observa-se ocorrência de floema e xilema secundário, porém com presença de córtex além do início de uma periderme de origem nas camadas mais externas do córtex (B e C). Divisão celular intensa nos planos: anticlinal (seta vermelha), periclinal (seta azul) e oblíquo (seta verde; e plano de divisão assimétrico (C). Esporos de *P. brassicae* nas células parênquimáticas do no córtex e do cilindro vascular e em pelo menos duas fases de seu ciclo e esporos de resistência plasmódio secundário (E e F)..... 105
- FIGURA 29. Micrografias óticas de cortes transversais da região de absorção de raízes de plântulas de couve-flor (*Brassicae oleraceae*) corados com azul de toluidina após terem sido mantidas em solução nutritiva simples com 60 uM.L⁻¹ alumínio e *P. brassicae* por 30 dias. Visão geral do tumor vascular, sem organização anatômica de raiz (B e C); Células parenquimáticas aglomeradas, de arranjo frouxo, com presença de feixe vascular e ausência de epiderme, semelhante a um calo (B); Células com patógeno agrupadas e hipertrofiadas (D e E); Tecido desorganizado e mais frouxo na periferia (F)..... 106

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

$\sqrt{\quad}$ - raiz quadrada
% - porcentagem
® - marca registrada
°C – Graus centígrados
 μL – microlitro
 $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ - pH do solo em gua
SEV- severidade em escala de notas
VRH- volume de raiz com hérnia
VRS- volume de raiz sadia
VRT- volume de raiz total
PRH- porcentagem de raiz com Hérnia
PRS - porcentagem de raiz sadia

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPITULO I. FATORES DO SOLO RELACIONADOS COM A SEVERIDADE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS EM NOVA FRIBURGO, RJ.....	3
ABSTRACT.....	4
2. INTRODUCTION.....	5
3. MATERIALS AND METHODS.....	7
4. RESULTS.....	13
5. DISCUSSION.....	14
6. REFERENCES.....	21
CAPITULO II. CARACTERIZAÇÃO DE UNIDADES FAMILIARES EM NOVA FRIBURGO-RJ QUANTO AO MANEJO DA COUVE-FLOR E DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS.....	24
RESUMO.....	25
7. INTRODUÇÃO.....	26
8. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
9. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
10. CONCLUSÕES.....	40
11. REFERÊNCIAS.....	41
CAPITULO III. RELAÇÃO ENTRE ATRIBUTOS FÍSICO, QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO DOS SOLOS E OCORRÊNCIA DE HERNIA DAS CRUCIFERAS EM ÁREAS DE CULTIVO DE COUVE-FLOR.....	45
RESUMO.....	46
12. INTRODUÇÃO.....	47
13. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
14. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
15. CONCLUSÕES.....	60

16. REFERÊNCIAS.....	61
CAPITULO IV. DOSES DE CALCÁRIO PARA CORREÇÃO DA ACIDEZ DO SOLO E SEUS EFEITOS NO CONTROLE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS E DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS DE COUVE-FLOR.....	65
RESUMO.....	66
17. INTRODUÇÃO.....	67
18. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
19. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	72
20. CONCLUSÕES.....	83
21. REFERÊNCIAS.....	84
CAPITULO V. EFEITO DO ALUMINIO E <i>Plasmodiophora brassicae</i> NA ANATOMIA RADICULAR E CRESCIMENTO DE COUVE-FLOR.	88
RESUMO.....	89
22. INTRODUÇÃO.....	90
23. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
24. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	95
25. CONCLUSÕES.....	108
26. REFERÊNCIAS.....	109
27. CONCLUSÕES GERAIS.....	112
ANEXOS	113
A - Questionário aplicado aos produtores de couve-Flor em Nova Friburgo.....	113
B - Descrição dos <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos gerados na amplificação do da região 16S do rDNA de bactérias.	115
C - Resumo da análise de variância dos atributos do solo do solo aos 70 dias após a correção, antes do transplântio.....	116
D - Resumo da análise de variância.....	117
E - Resumo da análise de variância.....	118
F - Resumo da análise de variância.....	119
G - Resumo da análise de variância.....	120
H - Resumo da análise de variância.....	121

I - Resumo da análise de variância.....	122
J - Resumo da análise de variância.....	123
K - Resumo da análise de variância.....	124
L - Resumo da análise de variância.....	125
M - Resumo da análise de variância.....	126

1. INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as espécies de hortaliças cultivadas em Nova Friburgo-RJ, a couve-flor constitui a mais importante, principalmente no inverno, destacando por sua expressão econômica na região.

As brássicas estão sujeitas a várias enfermidades, e em Nova Friburgo-RJ o destaque é a hérnia das crucíferas, causada pelo *Plasmiodiophora brassicae* (MAY *et al.* 2007; FILGUEIRA 2008). Esta doença tornou-se um fator limitante ao cultivo de diferentes espécies de *Brassicaceae* como a couve-flor e várias outras hortaliças como couve comum, brócolis, couve-chinesa além de canola e várias outras espécies da família *Brassicaceae* em todo mundo (DIXON 2009a).

Esta doença é causada por um protozoário habitante do solo e parasita obrigatório. Este fitopatógeno apresenta ciclo de vida complexo que inicia a partir do inoculo primário constituído por esporos de resistência dispersos por tecido podre da raiz do hospedeiro no solo.

Os sintomas típicos da doença são galhas radiculares que resultam na redução do sistema radicular ativo das plantas e no desenvolvimento de sintomas secundários como murchas nos horários mais quentes do dia, subdesenvolvimento, amarelecimento das folhas e, em casos mais graves, morte da planta (WALLENHAMMAR 1998, DIXON 2009a, KAGEYAMA e ASANO 2009, HWANG *et al.* 2011 a,b).

Dentre os fatores que favorecem a ocorrência da doença estão à umidade do solo, principalmente quando excede a 70% da capacidade de campo (HORIUCH e HORRI, 1980), a temperatura entre 12-30°C que favorece a germinação dos esporos de resistência (ROSA *et al.* 2010) e a acidez do solo. Segundo Buczacki (1983); Donald e Porter, (2009); Gossen *et al.* (2014), a doença é controlada quando o pH do solo está acima 7,2, por desfavorecer a germinação dos esporos de resistência.

O controle da doença é difícil devido à capacidade do patógeno sobreviver por períodos longos na forma de esporos de resistência e fácil dispersão destes (DIXON 2009a), sendo mais viáveis as medidas preventivas tais como: o uso de mudas saudáveis, cuidados com a qualidade da água de irrigação, dando prioridade para áreas com boa drenagem, redução da movimentação do solo por maquinários e implementos (REIS, 2009) visando redução da dispersão do inoculo inicial. Ainda se destaca como controle preventivo, a escolha da época de plantio no intuito de desfavorecer as condições favoráveis ao patógeno, como épocas mais secas (GOSEN *et al.* 2012)

A aplicação de calcário, por meio da prática conhecida como calagem, é a forma mais prática e econômica para elevação do pH do solo e fornecimento de cálcio e magnésio. Em adição, possui outros efeitos positivos como a neutralização do alumínio, aumento na disponibilidade de nutrientes e da atividade microbiana. Assim, a alteração do pH do solo é um dos fatores mais tradicionais na tentativa de controle da doença.

Apesar de inúmeros trabalhos abordando o efeito do pH e dos níveis de Ca do solo sobre o desenvolvimento, não há referências sobre a relação entre a acidez, teor de Al trocável e a severidade da doença. Vários autores relatam o pH como medida da acidez do solo, porém não relacionam a influência direta ou indireta do Al na severidade da Hérnia, mesmo sendo esta uma forma de acidez do solo denominada de acidez trocável (SOUSA *et al.* 2007).

A utilização de compostos orgânicos pode ser interessante agronomicamente por contribuir para a sanidade do sistema radicular da planta, promovendo uma melhor estrutura do solo e aumentando sua atividade microbiana, que tem uma importante função na supressão da hérnia das crucíferas (PENALBER 2009; MURAKAMI *et al.* 2000b). Por isso, é necessário conhecer os fatores que podem influenciar e favorecer a diversidade microbiana e o impacto causado por ela na população de *P. brassicae* no solo.

O Capítulo I refere-se aos fatores do solo relacionados com a severidade da Hérnia no Rio de Janeiro, Brasil. Esse capítulo teve como objetivo identificar as relações entre os atributos do solo e a severidade da doença no cultivo de couve-flor no município de Nova Friburgo-RJ.

O Capítulo II refere-se à caracterização de unidades familiares em Nova Friburgo-RJ quanto ao manejo da couve-flor e da hérnia das crucíferas, e teve como objetivo identificar as práticas de manejo e relacionar com a ocorrência da hérnia das crucíferas, em 3 comunidades produtoras de couve-flor no município.

O Capítulo III trata da relação entre atributos físicos, químicos e microbiológicos do solo e ocorrência de hérnia das crucíferas em áreas de cultivo de couve-flor, visando observar quais os atributos que estão influenciando na ocorrência do *P. brassicae* e na diversidade bacteriana destes solos.

O Capítulo IV teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes doses de calcário na correção da acidez do solo e na melhoria de sua fertilidade e a resposta de duas cultivares de couve-flor quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, redução da severidade da hérnia das crucíferas e produtividade em Nova Friburgo, RJ.

E por fim no capítulo V, avaliou-se o efeito do alumínio e de *Plasmiodiophora brassicae* na anatomia radicular e crescimento da couve-flor.

CAPITULO I

FATORES DO SOLO RELACIONADOS COM A SEVERIDADE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS NO RIO DE JANEIRO, BRASIL.

Special Report

Soil Factors Related to the Severity of Clubroot in Rio de Janeiro, Brazil

Aline da S. Bhering¹; Margarida G. F. do Carmo¹; Talita de S. Matos²; Erica S. A. Lima²; Nelson M. B. do Amaral Sobrinho²

¹Department of Crop Sciences and ²Department of Soils, Institute of Agronomy, Federal Rural University of Rio de Janeiro (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), BR 465, km 7, CEP 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author: Aline da S. Bhering; email: bheringas@gmail.com

ABSTRACT

Soil pH and calcium levels are determining factors in the success or failure of managing clubroot during the cultivation of *Brassica* spp. The aim of the present study was to evaluate the influence of soil attributes in tropical regions on the development of roots and clubroot and the accumulation of biomass and nutrients in cauliflower. One hundred and fifty-one samples of soil and plants samples were collected from 16 family farms that have a history of more than 50 years of regular cauliflower cultivation in Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil. Chemical and physical analyses were performed on the soil samples, and the severity of clubroot and the accumulation of biomass and macronutrients in individual plants and plant tissues. Clustering and main principal component analyses were performed on the data. The disease occurred on all farms, but with different intensities. A direct relationship was observed for the soil attributes (acidity and exchangeable aluminum content in particular) with the percentage of roots with clubroot and with the accumulation of biomass and macronutrients in the different plant organs. To reduce losses from clubroot in weathered soils, practices should aim to reduce the pathogen's inoculum potential and improve the physical and chemical conditions of the soil, which would favor root development of the plants.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *botrytis*, *Plasmodiophora brassicae*, root volume, aluminum, weathered soils, tropical region.

2. INTRODUCTION

Clubroot disease is caused by *Plasmodiophora brassicae* (Wor.), and occurs widely in humid areas with routine cultivation of *Brassica* spp., whether in temperate or tropical high-altitude areas (DIXON 2009b). In Brazil, its occurrence has been recorded in the states of Rio Grande do Sul and São Paulo (DIXON 2009b, RUARO *et al.* 2009), and it is widely observed in the mountainous region of the state of Rio de Janeiro (GRISEL and ASSIS 2012).

The incidence and severity of clubroot worsens with increased frequency and intensification of brassica vegetables cultivation, such as cauliflower (*B. oleracea* L. var. *botrytis* L.), bok choy (*Brassica pekinensis* L.), broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck), and canola (*Brassica napus* L.) (DIXON 2009b; GOSSSEN *et al.* 2014). The life cycle of *P. brassicae* is complex and can be divided into two phases: 1) germination of the resting spores under stimulation from root exudates of host species, release of the primary zoospores, and subsequent infection of the root hairs, and 2) colonization and proliferation of the pathogen in the cortex of the roots and subsequent formation of root galls (NIWA *et al.* 2008). As the disease progresses, there is a reduction in the effective root system of the plant and, consequently, a reduction in the water and nutrient absorption process, which leads to the appearance of secondary symptoms, such as wilting during the hottest hours of the day, stunting and reduced biomass production and commercial quality of the vegetables (GOSSSEN *et al.* 2013). With the decay and decomposition of the infected roots comes the release of resting spores that survive in the soil for long periods, even in the absence of a host (WALLENHAMMAR 1996).

The severity of disease and subsequent losses are related to the pathogen population (e.g., inoculum density and distribution), to the host plant (level of susceptibility and life cycle), and to physical (texture, humidity, and temperature), chemical (pH and levels of Ca, N, and B), and biological (macro- and microflora) factors of the soil (DONALD and POTER 2009; DIXON 2009a; SHARMA *et al.* 2011; GOSSSEN *et al.* 2014). The losses caused by clubroot in susceptible crops are increased by sequential planting of host species, frequent soil turning, movement of machinery and implements, and regular irrigation, which increase pathogen survival and dissemination and subsequent plant infection. These losses, however, are difficult to quantify and may vary according to plant species, the timing of initial infection, and the age of the plant (DIXON 2009a; GOSSSEN *et al.* 2014). Disease quantification is complex and is done using descriptive (WALLENHAMMAR *et al.* 2000) or numeric scales (TAKAHASHI *et al.* 2005).

There is consensus in the literature that pH and Ca levels in the soil are determining factors in the management of clubroot because they affect the longevity and germination of resting spores and the infection and colonization of the root hairs (DIXON 2014). The effects of pH and Ca on clubroot are independent and complementary, but the effect of pH dominates because pH also regulates Ca solubility in the soil (NIWA *et al.* 2007; DIXON 2009a). Increasing the pH to values equal to or greater than 7.2 is recommended for controlling clubroot. However, failures with this method have been reported and these have been attributed to the high inoculum potential in the soil and issues such as the method used for applying and incorporating limestone, its neutralization power and granulometry, and the moisture and texture of the soil (DONALD and PORTER 2009). High levels of organic matter (OM) in the soil have also been associated with suppression of and reduction in losses due to clubroot; however, there are conflicting reports (Dixon 2014; Gossen *et al.* 2013).

Generally, studies on clubroot have focused on the pathogen's behavior and its interaction with the host plant but have not addressed the morphological, physiological, and nutritional characteristics of the plant itself. Cauliflower typically presents root growth to a

depth of 85 to 115 cm. This plants horizontal root growth is approximately three times as extensive as its vertical growth, with intense branching and root hair production in the upper soil layers. Branching and root hair production increase with increasing N supply (Thorup-Kristensen and Boogaard 1998). Cauliflower has a high water demand and is irrigated from planting until harvest to maintain moisture close to field capacity. In terms of soil fertility, cauliflower responds best when grown in soils with a pH between 6.0 and 6.8, with a base saturation of 80%, and with high levels of macro- and micronutrients (May et al. 2007). The availability of micronutrients for plants in soils with pH equal to or greater than 7.2 is reduced and can lead to deficiency symptoms in the plant (Meurer et al. 2007). Moreover, acidic soils with a pH of less than 5.5 favor the disease, reduce the availability of Ca, K, Mg, and P, and increase the concentration of Al^{+3} , which is phytotoxic (Meurer et al. 2007).

The present study was conducted in the municipality of Nova Friburgo, located in the mountainous region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. This region has high natural vulnerability to water erosion, due to its rugged topography, and a predominance of family farmers who are organized in associations and share machinery and implements. Acidic soils are also common. These conditions favor the dispersion of *P. brassicae* and clubroot development. The farmers intensively cultivate vegetables all year round due to the area's favorable climate (mean temperatures of 18.4° C and precipitation of 1372 mm per year) (CLIMATE-DATA, 2016). Previous soil fertility surveys performed in the region at more than 400 different cauliflower and tomato cropping sites point to recurrent failures to correctly manage soil fertility, including not conducting soil acidity amelioration, excessive and unbalanced use of chemical fertilizers, and the use of large amounts of fresh poultry manure (i.e., uncomposted). Despite these shortcomings, the municipality is the largest producer of cauliflower in Brazil (IBGE 2006; GRISEL and ASSIS 2012).

This study aimed to evaluate the influence of soil attributes on the development of roots and clubroot in cauliflower and on the accumulation of biomass and nutrients in the plants.

3. MATERIALS AND METHODS

The study was conducted on 16 family farms that have a history of more than 50 years of regular cauliflower cultivation in the communities of Serra Nova, Serra Velha and Rio Grande in the municipality of Nova Friburgo, Rio de Janeiro state (RJ), Brazil (22° 17' 14''S and 42° 32' 01''W). Initially, a survey of the farms was performed to determine the history of soil usage, soil characteristics, and management practices adopted. The selected farms have steep slopes and intensive soil preparation is routinely performed via plowing and harrowing using machines and tools shared by the community of growers. Soil conservation practices have not been adopted. On all 16 farms, large amounts of chemical fertilizers were applied at planting and as a top-dressing. Planting fertilizations were done with simple and triple superphosphate, urea and KCl. In general, top-dressing fertilizations were done with uncomposted poultry manure (approximately 30 Mg / ha), applied about four weeks after planting, and with urea plus KCl, applied about six and nine weeks after planting. Foliar fertilization with micronutrients were also made. Fertilization is usually not based on results of soil analyses and liming is not performed on most of the farms.

All plantings used one of the two standard plant spacings (0.60 x 0.60 m or 0.70 x 0.70 m) giving a mean population of 27,777 and 20,408 plants/ha, respectively. Sampling was performed in August/September 2013 (the winter harvest) when the plants, cvs. Bola de Neve or Teresópolis Gigante, were nearly ready to be harvested, approximately 80 to 90 days after transplanting.

In each farm, about 8 to 10 whole plants and the soil around these plants were harvested. In total, 151 samples of soil and 151 plant samples were obtained in the study region. Samples were harvested every 20 m in zig-zag pattern traversing from the highest point to the lowest of the terrain. Plants were selected at commercial harvesting point, that is, with fully developed inflorescences and flower buds attached.

For the harvest of the aerial part of the plants, the flush cut was performed at the base of the plant, separating the aerial part from the root. The aerial part of each plant was divided into leaves, stems, and inflorescence, and the fresh weight of each organ was determined.

In order to maintain the integrity of the roots, these were collected together with the soil - in undisturbed soil samples (centered on each root). These samples were collected with the aid of a metal cylinder 25 cm in diameter and 30 cm deep. The samples of soil plus the roots contained in the cylinders were carefully removed, labeled, and transported to the laboratory. The volumes containing the soil and roots were broken up, and the roots were carefully separated, washed to remove the remaining soil, and then analyzed.

The fresh weight of root was determined. Subsequently, the healthy roots and roots with galls were separated. Their fresh weights were measured, and their volumes were determined by measuring the volume of water displaced by galls and by the healthy roots in a graduated beaker. The percentages of roots with clubroot (PVCR) and percentages of healthy roots (PVHR) were calculated by using the ratio of the root volumes with clubroot (VCR) and the healthy root volumes (VHR), respectively, to the total root volume (VTR).

To determine the dry weight, the different organs of the plants (stems, leaves, inflorescence, and roots) were dried in a forced-air oven at 60°C until a constant weight was reached (about 96 hours). Dried organs were then ground in an IKA model A-11 analytical mill, and 1.0 g portions were taken to determine the Ca, Mg, K, and Al content of each organ of each plant. These samples were digested by wet processing in a MARS Xpress® Digestor (CEM brand) using the SW-846 3051A method (USEPA, 2007) with 10 ml of HNO₃ (VETEC 65%) (1600 W power for 16 min at 180°C). After digestion, the total concentrations of Ca, Mg, and Al were quantified in the extracts using a Perkin Elmer OPTIMA 3000 plasma emission

spectrometer (ICP-OES) with detection limits of 0.021, 0.027, and 0.089 mg/kg and quantification limits of 0.07, 0.09, and 0.30 mg/kg, respectively. The content of K in the extracts was measured in a Digimed DM-62 flame photometer (Digimed Analytical Instruments, São Paulo, Brazil) with a detection limit of 0.5 mg/kg and a quantification limit of 1.0 mg/kg. The detection limit of the method was calculated as three times the standard deviation of the blank sample of all the analyses (10 repetitions). The certified sample “SRM 1573a - Tomato Leaves”, certified by the National Institute of Standards and Technology (NIST, 1995), was the reference material used as an analytical standard. This sample had the following concentrations: 50.5 ± 0.9 g/kg of Ca (93% recovery), 27.0 ± 0.5 g/kg of K (92% recovery), and 598 ± 12.0 mg/kg of Al (93% recovery). The results obtained from the certified reference materials were within the ranges accepted by NIST as normal for plant samples. The nitrogen content was determined from 1.0 g samples dried directly by combustion, using the Dumas method in RapidN Cube equipment.

Samples from the undisturbed soil cores were collected and frozen to count the number of resting spores of *P. brassicae* using the modified method of Murakami et al. (2000). Moreover, 1 g soil samples were suspended in 50 ml of distilled and autoclaved water and stirred for 5 min. The pH of the suspension was then adjusted to 10.0 using 1 M NaOH, and the suspension was then subjected to another 5 min cycle of stirring. At the conclusion of the cycle, the pH of the suspension was readjusted to 9.0 with 1 M NaOH, followed by another 5 min cycle of stirring. The sample was sieved in a filter formed by four layers of muslin cloth, and the filtered sample was then centrifuged at 2000 rpm for 10 min (New Instruments Benchtop Centrifuge, model NI1814). The residue was washed with distilled and deionized water, centrifuged three more times at 2000 rpm for 10 min, and finally resuspended in 50 ml of distilled water. To facilitate visualization of the spores, 90 μ l of cotton blue was added to 400 μ l aliquots of the suspension. The number of resting spores was counted in three samples from each suspension with the aid of a hemacytometer and visualization at 100X magnification under an optical microscope.

For the assessment of soil attributes, the soil samples were processed (air-dried and passed through a sieve with a 2.0 mm diameter mesh), and chemical analyses were performed to determine the levels of organic matter (OM), pH (H₂O), assimilable P and exchangeable K, Ca, Mg and Al (Al⁺³), the potential acidity (H+Al), the cation exchange capacity (CEC) at pH 7.0, in accordance with the methodology of EMBRAPA (DONAGEMMA et al. 2011), and the levels of B in accordance with the azomethine-H methodology (Abreu et al. 1994, modified). For the extraction of B, 10 g aliquots of soil plus 20 ml of extraction solution at 1.25 M (BaCl₂.2H₂O) were heated for 8 min using a microwave at 700 W. Aliquots of 2 ml were taken from each extract, and 2 ml of azomethine-H solution and 2 ml of buffer solution were added, followed by a spectrophotometer reading at 420 nm. For validation of the Ca, Mg, and K levels in the soil samples, the "NIST SRM 2709a - San Joaquin Soil" certified sample was used, which had the following concentrations: Ca (19.1 ± 0.9 g/kg and 95% recovery), Mg (14.6 ± 0.2 g/kg and 95% recovery), K (21.1 ± 0.6 g/kg and 96% recovery), and Al⁺³ (75.7 ± 0.16 mg/kg and 91% recovery). The results of the analyses were within the ranges accepted by NIST (1995) as normal for soil samples.

The data for the soil attributes, development of the cauliflower plants and intensity of the clubroot (Table 1) were subjected to multivariate analysis of the main components, clustering, and cross-validation in the discriminant analysis using R software (R Core Team, version 3.2) and descriptive analysis using Microsoft® Office Excel®.

To assess the relationships between soil attributes, development of the cauliflower plants, and intensity of the clubroot, principal component analysis (PCA) was performed using prcomp function of R software (R Core Team, version 3.2). The Pearson correlation between

the response variables was measured before carrying out the PCA. To minimize the autocorrelation effect, the highly-correlated variables were removed from the analysis. Among the variables with autocorrelation, we selected those that had higher coefficients of correlation with variables related to clubroot intensity.

To identify samples with similar characteristics, cluster analysis was performed according to the soil attributes. The Euclidean distance was used as a measure of similarity, while Ward's hierarchical method was used as a clustering algorithm. This minimized the sum of squares (SSQ) within the groups such that more homogeneous groups were formed in each clustering step (Hair et al. 2005). For this, the soil attributes were used as clustering variables with standardized data for the mean 0 and variance 1. To interpret and combine the groups, a link distance greater than 1.25 times the standard deviation of the link distance between all the observations was adopted as the cutoff point (MILLIGAN & COOPER 1985). For selection of the correct number of groups, cross validation was performed in the discriminant analysis using the same discriminating variables that were used in the clustering and assuming equality of the covariance matrix and the classification probabilities to be equal among groups. Once the groups were identified, the respective parameters for the position (mean) and amplitude (standard deviation, minimum, and maximum) of the different variables related to the soil attributes, plant development, and intensity of the clubroot were calculated. These data are presented graphically and in tables.

Table 1. Variables of soil attributes, intensity of clubroot attributes and development of cauliflower plant attributes used in multivariate and descriptive analysis.

Variables	Abbreviation
Soil attributes	
Soil pH in water	pH _(H2O)
Levels of macronutrients: total N, assimilable P and exchangeable K, Ca and Mg	N, P, K, Ca and Mg
Potential acidity	H+Al
Exchangeable aluminum	Al ³⁺
Clay	Clay
Organic matter	OM
Extractable boron	B
Cation exchange capacity at pH 7.0	CEC
Clubroot intensity attributes	
Concentration of resting spores of <i>P. brassicae</i> in soil	SPO
Clubroot severity estimated with scale ¹	SEV
Volume of healthy roots	VHR
Volume of roots with clubroot	VCR
Total root volume	VTR
Percentage of healthy roots - (VHR/VTR)*100	PVHR
Percentage of roots with clubroot - (VCR/VTR)*100	PVCR
Plant development attributes	
Plant biomass accumulation	
Total fresh and dry weight of cauliflower plants	TFW and TDW
Dry weight of stem	SDW
Dry weight of inflorescence	IDW
Dry weight of root	RDW
Dry weight of leaf	LDW
Macronutrients and aluminum accumulation in plant and plant organs	
N, K, Ca and Mg accumulated in cauliflower plants	NAT, KAT, CaAT and MgAT
N, K, Ca and Mg accumulated in the stem	NAS, KAS, CaAS and MgAS,
N, K, Ca and Mg accumulated in the leaf	NAL, KAL, CaAL and MgAL,
N, K, Ca and Mg accumulated in the inflorescence	NAI, KAI, CaAI and MgAI,
N, K, Ca and Mg accumulated in the root	NAR, KAR, CaAR and MgAR,
Aluminum accumulated in the root	AlAR
Principal component analysis	PCA

¹ Numeric scales of Takahashi et al. (2005).

Table 2. Mean, standard deviation (SD), and minimum and maximum values of the severity of clubroot, expressed by the percentages, in volume, of healthy roots and roots with clubroot; number of spores of *Plasmodiophora brassicae* in the soil; total dry weight; and the dry weights for the inflorescence, leaves, stems, and roots of cauliflower plants in the two groups of plants formed by cluster analysis: Group 1 and Group 2 (G1 and G2).

	Root Volume (%)		Spores g /soil (x10 ⁶)	Dry weight (g)				
	Healthy	Clubroot		Total	Inflorescence	Leaf	Stem	Root
Group 1¹								
Mean	42.99	57.01	7.8	315.84	76.56	181.71	32.77	29.27
SD	25.44	25.44	3.5	90.33	22.13	82.62	10.69	15.88
Minimum	5.00	7.69	1.5	128.23	41.92	44.93	10.96	12.24
Maximum	92.31	95.00	29.0	697.00	149.46	576.11	64.08	119.17
Group 2¹								
Mean	25.01	74.99	13.0	232.24	54.86	134.77	23.12	24.59
SD	10.77	10.77	8.5	79.80	18.55	68.67	6.49	9.23
Minimum	7.14	43.28	1.2	110.55	10.07	44.93	7.92	9.00
Maximum	56.72	92.86	39.0	385.75	85.13	275.24	32.21	52.95

¹ Groups 1 and 2 formed by cluster analysis according to the soil attributes.

Table 3. Mean, standard deviation(SD), and minimum and maximum values of soil attributes in the two groups of plants formed by cluster analysis, Group 1 and Group 2 (G1 and G2), of the areas sampled to study clubroot in cauliflower.

Group 1	pH	K	P	Ca	Mg	H+Al	Al	CEC	Clay	OM	B	N
Mean	5.27	250.51	214.72	4.48	0.91	6.61	0.35	12.75	369.96	31.75	0.75	2.00
SD	0.51	114.79	165.71	1.88	0.31	2.54	0.44	3.04	84.26	8.08	0.60	0.66
Minimum	4.20	38.00	42.00	0.90	0.20	0.70	0.00	4.99	119.00	9.65	0.20	0.90
Maximum	6.40	714.00	638.00	10.90	1.70	13.60	2.10	22.08	570.00	58.44	3.60	3.60
Group 2	pH	K	P	Ca	Mg	H+Al	Al	CEC	Clay	OM	B	N
Mean	4.98	231.52	202.09	3.89	0.73	7.11	0.61	12.40	358.11	29.47	1.02	1.68
SD	0.36	134.36	137.80	2.27	0.31	1.41	0.58	2.85	60.99	5.86	0.95	0.56
Minimum	4.00	76.00	42.00	1.30	0.30	4.00	0.00	7.42	187.00	12.59	0.02	0.00
Maximum	5.70	869.00	638.00	10.80	1.40	9.90	1.80	20.25	475.00	40.51	4.40	2.80

pH = pH in water; K = exchangeable potassium (mg/kg); P = assimilable phosphorus (mg/kg); Ca = exchangeable calcium (cmolc/kg); Mg = exchangeable magnesium (cmolc/kg); H+Al = potential acidity (cmolc/kg); Al = exchangeable aluminum (cmolc/kg); CEC at a pH of 7.0 (cmolc/kg); Clay = clay (g/kg); OM = organic matter (g/kg); B = extractable boron (mg/dm³); and N = total nitrogen (g/kg). Groups 1 and 2 formed by cluster analysis according to the soil attributes.

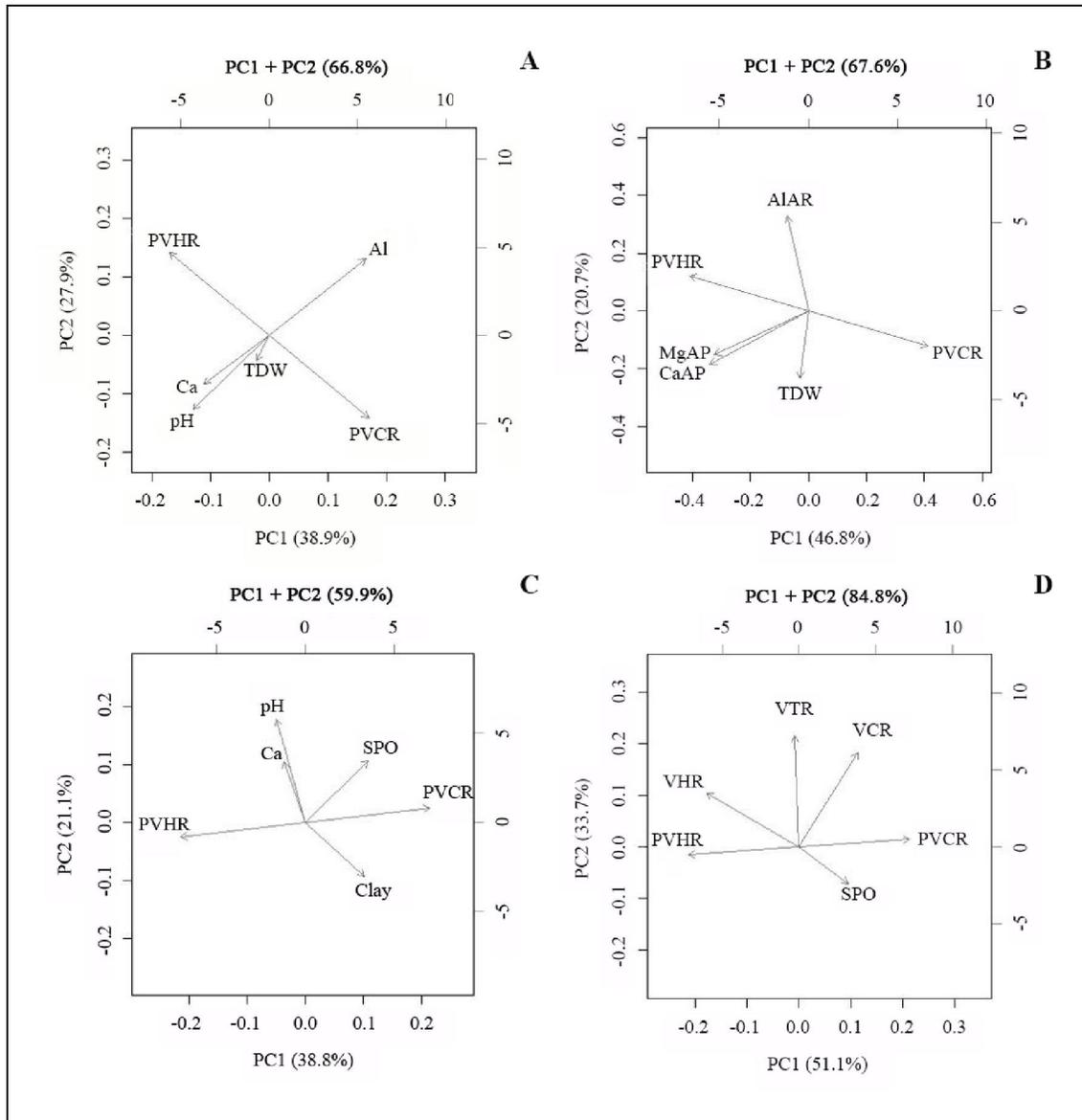


Fig. 1. Principal component analysis (biplot graph) relative to the study of clubroot in cauliflower. **A)** Soil attributes x severity of the clubroot; **B)** severity of the clubroot x accumulation of Ca and Mg in the plant and Al in the root x biomass production of the plant; **C)** soil attributes x severity of the clubroot and concentration of spores in the soil; and **D)** number of spores x root attributes. **Al** = exchangeable aluminum; **pH** in water; **Ca** = exchangeable calcium; **TDW** = total dry biomass of the plant; **PVCr** = percentage of roots with clubroot; **PVHR** = percentage of healthy roots; **AlAR** = aluminum accumulated in the root; **CaAP** and **MgAP** = accumulated calcium and magnesium in the plant; **SPO** = concentration of spores of *P. brassicae* in the soil; **Clay** = clay; **VTR** = total root volume; **VHR** = healthy root volume; and **VCR** = root volume with clubroot.

4. RESULTS

Plants with clubroot were found on all of the 16 family farms at varying intensities. Better correlations between the production of biomass by plants and measurements of clubroot severity were obtained with the volume data (PVCR; $r = -0.26$) compared to the severity estimated based on the scale (SEV; $r = -0.010$). PVCR ranged from 7.69 to 95.0%, while SPO ranged from 1.5×10^6 to 39.0×10^6 spores of *P. brassicae* per g of soil (Table 2). There was a large variation among the soil samples for their attributes, especially those associated with soil acidity - pH, K, Ca, H + Al and Al^{+3} , detectable by their minimum and maximum values (Table 3). It was also observed a great variation among the plant samples for the accumulation of dry matter in the inflorescences, leaves, stems, roots and total (Table 2). The accumulation of Al in the roots also varied significantly according to the sample, from 0.0002 to 0.1844 g / root.

The relationship among the soil attributes, the development of the cauliflower plants, and the intensity of the clubroot was identified through PCA. Components 1 and 2 (PC1+PC2) of the PCA between pH, Ca, and Al^{+3} in soil and PVHR, PVCR, and TDW explain 66.8% of the observed variance (Fig. 1A). Components 1 and 2 (PC1+PC2) between CaAT, MgAT, AlAR, and TDW and PVCR and PVHR, explain 67.6% of the observed variance (Fig. 1B). Components 1 and 2 (PC1+PC2) between pH, Ca, and clay in soil and SPO, PVCR, and PVHR explain 60.0% of the observed variance (Fig. 1C). Components 1 and 2 (PC1+PC2) between SPO, PVCR, and PVHR and VTR, VHR and VCR explain 84.8% of the observed variance (Fig. 1D). The TDW was directly related to the pH and level of exchangeable bases, Ca and Mg, in the soil and inversely related to Al^{+3} (Fig. 1A). The PVCR exhibited a direct relationship with the AlAR and an inverse relationship with the CaAT and MgAT (Fig. 1B). The SPO also exhibited a close relationship with the PVCR, an inverse relationship with the pH and exchangeable Ca of the soil (Fig. 1C), an inverse relationship with the VHR, and a direct relationship with the VCR (Fig. 1D).

In the cluster analysis, when using a link distance of 0.03 — equivalent to 1.25 times the standard deviation of the distance — as the cutoff point in the dendrogram (Milligan & Cooper 1985), eight groups were identified (Fig. 2). This result was subjected to cross-validation in a discriminant analysis for evaluating the overall error rate of the distribution of the samples in the groups. Due to the lower rate for classification errors (5.95%), only two groups were formed: Group 1 (G1) and Group 2 (G2), consisting of 107 and 44 samples, respectively (Fig. 2).

These two groups (G1 and G2) showed very distinct characteristics in relation to soil attributes, with consequent effects on the intensity of the clubroot and the accumulation of biomass in the plant, as well as macronutrients in the different organs of the plants and Al in the roots (Fig. 3). In comparison with Group 2 (G2), Group 1 (G1) was characterized by higher values for pH, exchangeable cations (Ca, Mg, and K), total N, and OM in the soil, as well as lower values for Al^{+3} and H+Al (Fig. 3A, Table 3), greater VHR and PVHR and lower SPO in the soil (Fig. 3B, Table 2), greater TDW, RDW, SDW, LDW and IDW (Fig. 3C, Table 2), greater accumulation of Ca, Mg, K, and N in the different organs of the plants and less accumulation of Al in the roots (Fig. 3D, Table 3). Group 2 (G2) stood out due to low soil pH values and high Al^{+3} content (Fig. 3A, Table 2), greater VTR and VCR, higher SPO (Fig. 3B, and Table 2), lower biomass accumulation in all the plant organs (Fig. 3C, Table 2), less accumulation of all nutrients, and, in particular, greater accumulation of Al in the roots (Fig. 3D, Fig 4). The macronutrients most accumulated by the plants were, in order, N, Ca, Mg, and K. Accumulation occurred predominantly in the leaves. Al was only detected in the roots (Fig. 4).

5. DISCUSSION

The study was located in a tropical climate zone in the state of Rio de Janeiro, Brazil. This area has been producing cauliflower for over 50 years, where recurrent problems with clubroot and its management occur. In this present study, we evaluated the effect of soil attributes on the root system, the severity of the disease, and the accumulation of biomass and nutrients in cauliflower plants. A direct relationship between soil acidity and Al^{+3} content with reduction in the VHR and an increase in the VCR were observed. A direct effect these variables on the accumulation of biomass and macronutrients in the plants was also observed.

The pH values recorded on these 16 farms ranged from very acidic (4.0) to appropriate (6.4) for the development of cauliflower, whose ideal range is between 6.0 and 6.8 (May et al. 2007). These values are lower than the value ($pH \geq 7.2$) reported as being suitable for the control of clubroot (DONALD and PORTER 2009; GOSSEN *et al.* 2014). The low pH resulted in conditions favorable for the development of clubroot as well as the increased availability of Al^{+3} in the soil. Al^{+3} causes a thickening, shortening, and reduction in branching of the roots and a drastic reduction in the growth of the aerial portion of plants (CLUNE and COPELAND 1999; ECHART and CAVALLI-MOLINA 2001; MEURER et al. 2007). PCA clearly showed that the variations in the development of clubroot, expressed by the percentage of healthy roots (PVHR), roots with clubroot (PVCR), and plant biomass production (TDW) were best explained by the strong negative relationship between soil pH and levels of Al^{+3} (Fig. 1A).

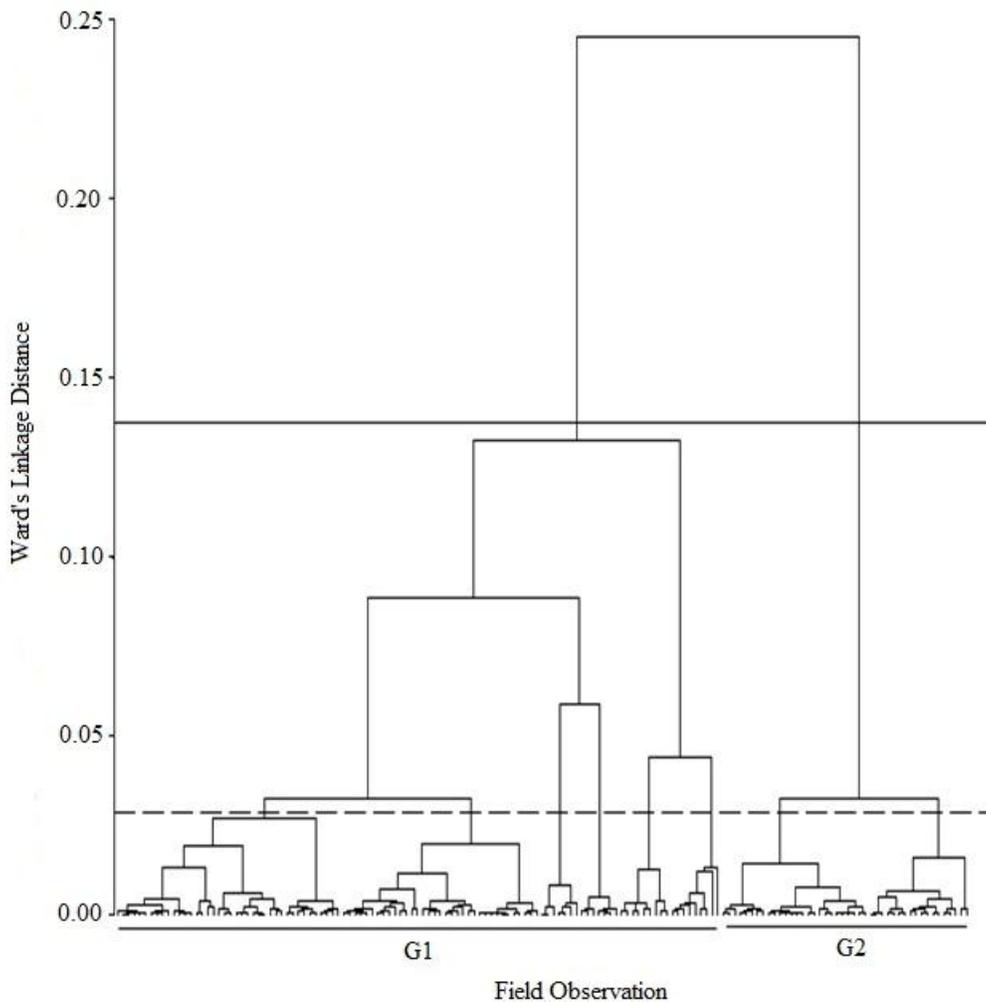


Fig. 2. Dendrogram related to the cluster analysis of the soil and cauliflower samples based on the mean soil characteristics established by the Ward method and Euclidean distance

Under the conditions studied, there are probably two factors acting directly on the reduction of the root system and the water and nutrient absorption efficiency of the plants: a chemical impediment caused by the phytotoxicity of Al^{+3} and the biological impediment due to infection and colonization of roots by *P. brassicae*. However, it is believed that the reduced development of the root system was partially offset by the application, in all 16 farms, of high doses of CaH_2PO_4 (simple and triple superphosphate) at the time of planting and the addition of N and K as a topdressing. In general, the levels of P and exchangeable Ca and K in the soil for all 16 farms are also higher than the levels recommended for the crop (May et al. 2007; Guerra et al. 2013). Thus, the production of cauliflower has been made possible by maintaining high levels of nutrients in the soil (Table 3). It is also believed that because of the high inoculum density ($>10^6$ spores/g of soil) and low to medium pH values on some of the farms, production was made possible by the low temperatures recorded during the crop cycle (10 to 15°C).

However, given that cauliflower is predominantly grown in temperate regions (FAO, 2006), where slightly weathered soils with pH values ranging from neutral to alkaline are

predominant, reports on limitations of its cultivation because of Al^{+3} are not common. These results are clearly supported by the inverse and very close relationships observed among the amount of Al accumulated in the roots, the accumulation of Ca and Mg in the plants and the total biomass production (TDW) (Fig. 1B). The data obtained do not enable separation of the effects caused by the disease from those caused by the phytotoxicity of Al^{+3} (Fig. 1A and 1B), and it is also not possible to determine a combined effect, thus indicating the need for further investigations. Although there are no previous reports for cauliflower, Al concentrations higher than 15 mM/L (equivalent to half the critical level in weathered soils) have been observed to strongly inhibit root growth in canola (*B. napus*) (CLUNE and COPELAND 1999).

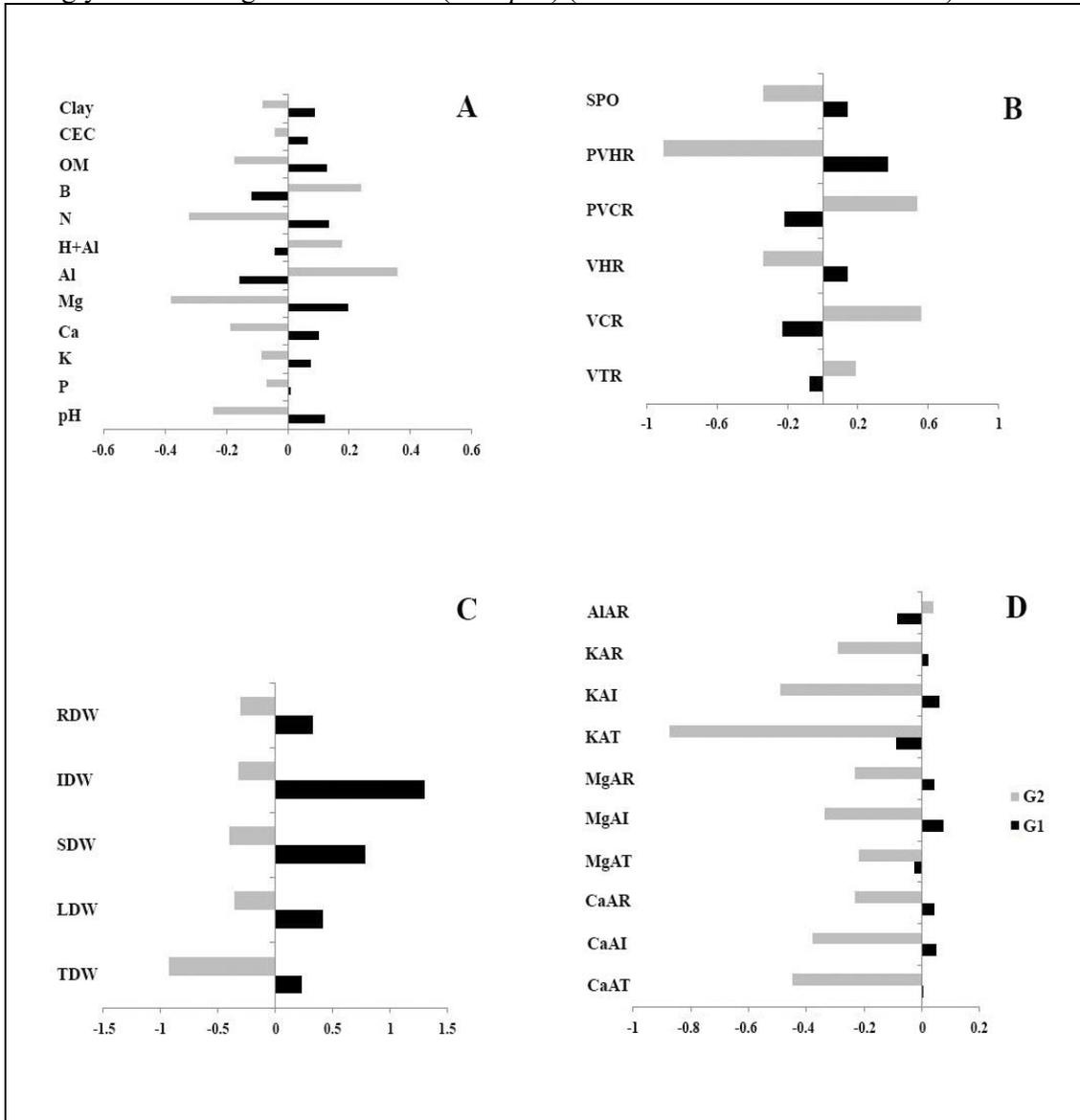


Fig. 3. Standardized mean of (A) soil attributes; (B) intensity of the clubroot; (C) biomass of the root, inflorescence, stem, leaf and total of cauliflower plants; and (D) N, K, Mg, and Ca accumulated in the inflorescence, stem, leaf, and root, as well as the aluminum accumulated in the cauliflower root in the two groups (G1 and G2) formed via cluster analysis. Clay = clay; CEC = cation exchange capacity at pH 7,0; OM= organic matter of the soil; B = extractable boron; N = total nitrogen; H+Al = potential acidity; Al = exchangeable aluminum; Mg =

magnesium; Ca = calcium; K = potassium; P = phosphorus; pH = pH in water; SPO = concentration of spores of *P. brassicae* in the soil; PVCr = percentage of roots with clubroot; PVHR = percentage of healthy roots; VHR = volume of healthy roots; VCR = volume of roots with clubroot; VTR = total root volume; RDW = dried weight of root; IDW = dried weight of inflorescence; SDW = dried weight of stem; LDW = dried weight of leaf; TDW = total dried weight; AlAR = aluminum accumulated in the root; KAT = total accumulated potassium; KAR = potassium accumulated in the root; KAI = potassium accumulated in the inflorescence; MgAT = total accumulated magnesium; MgAR = magnesium accumulated in the root; MgAI = magnesium accumulated in the inflorescence; CaAT = total accumulated calcium; CaAR = calcium accumulated in the root; and CaAI = calcium accumulated in the inflorescence.

The result of the cluster analysis (Figs. 2 and 3) shows that the cauliflower population sampled split into two distinct groups (G1 and G2) in relation to the characteristics discussed above. The soil samples in G1 had, on average, lower concentrations of H⁺Al and exchangeable Al, higher pH values, and higher concentrations of exchangeable Ca, Mg, K, and total N in comparison with those of G2 (Table 3, Fig. 3A). Of these attributes, the most significant differences were related to pH and exchangeable Al. The mean values of pH and exchangeable Al observed in G1 were 5.27 and 0.35 cmol_c/kg, respectively, while in G2, they were 4.98 and 0.6 cmol_c/kg, respectively. These pH values represent an increase of 100% in the levels of Al⁺³ in the soils of G2 compared to G1, reinforcing the hypothesis that Al⁺³ is a limiting factor for the production of cauliflower (Table 3). Similarly, G2 plants had a higher concentration of spores (13 x 10⁶ spores/g of soil) and greater PVCr (75%) and VCR (45.61 ml) compared to G1 plants (7.8 x 10⁶ spores/g of soil, PVCr = 57% and VCR = 29.02 ml) (Table 2, Fig. 3B). In G1, under more favorable soil conditions, lower mean inoculum density (SPO), higher pH, lower levels of Al⁺³ (Table 3, Fig. 3A), and greater production of dry weight were also recorded in all of the plant organs in comparison with G2 (Table 2, Fig. 3C). The greater production of total dry biomass and inflorescences in G1 (316 g/plant and 77 g/inflorescence, respectively) compared to that of G2 (232 g/plant and 55 g/inflorescence, respectively) represents a mean gain of 36% in total biomass and 5.9 t/ha of cauliflower or an additional production of inflorescences equal to 40%.

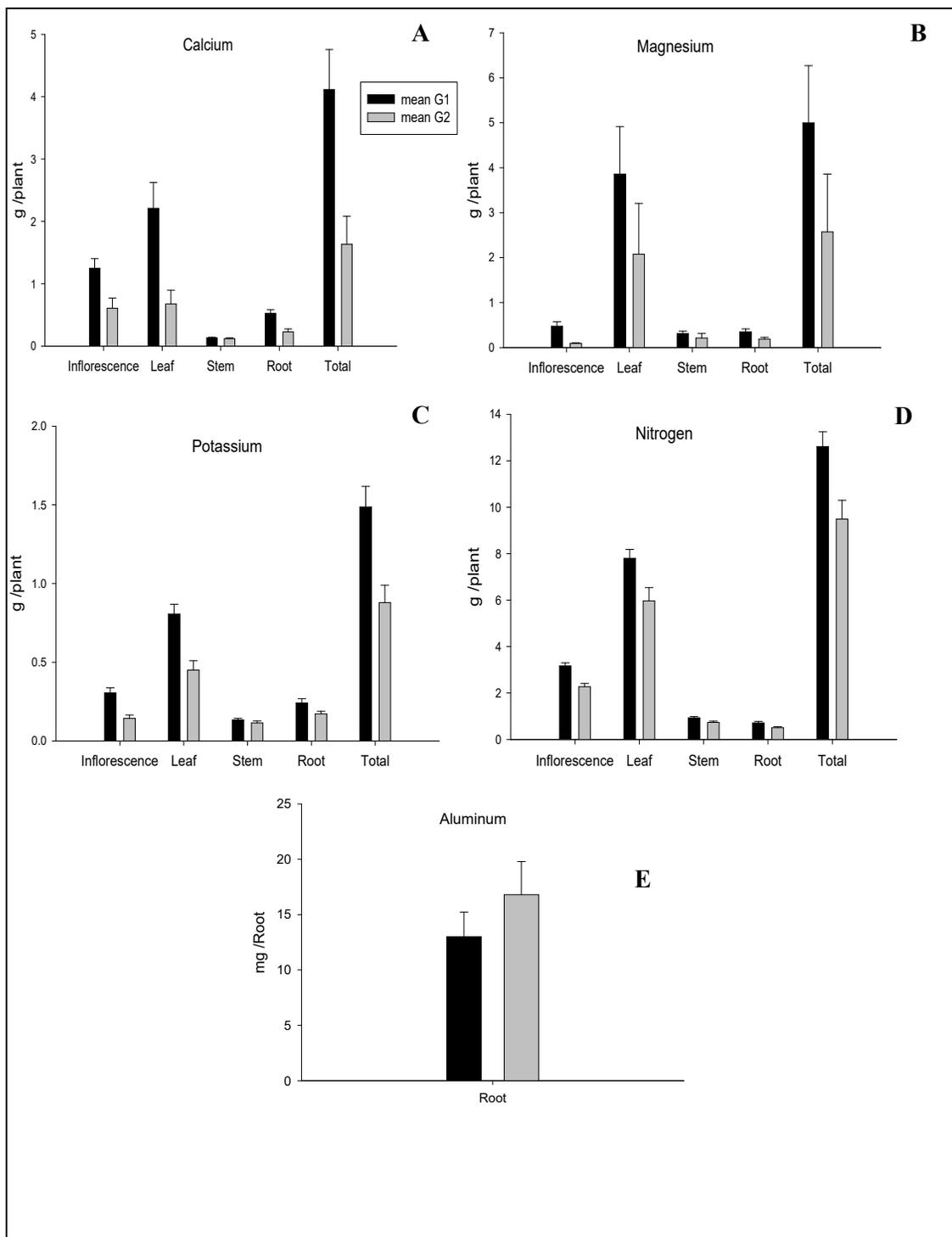


Fig. 4. For groups G1 and G2: mean amounts of (A) calcium, (B) magnesium, (C) potassium, and (D) nitrogen accumulated in the roots, inflorescences, stems, and leaves, as well as the total amounts; (E) aluminum accumulated in the roots of cauliflower plants.

These results were confirmed by the higher amounts of Ca, Mg, K and N accumulated in the roots, leaves and inflorescences of the plants of G1 in relation to those of G2 (Figs. 4A,

B, C, D). However, the amount of Al accumulated in the roots was approximately 25% higher in the plants of G2 compared to those of G1 (Fig. 4E).

The lower root Ca levels observed for G2 plants may have affected root hair penetration and infection by *P. brassicae* and other post-infection events. Ca levels have been reported to affect *P. brassicae* spore germination, root hair penetration and infection, and the maturation rate of the remaining pathogen stages (Dixon, 2009a), whereas Al^{3+} may inhibit a wide variety of essential metabolic processes regulated by Ca (ECHART and CAVALLI-MOLINA 2001).

Young et al. (1991) reported that soils suppressing clubroot were 3 to 15 times richer in Ca and Mg than soils favorable to clubroot. It should be noted, however, that the levels of exchangeable Ca, Mg, and K, as well as assimilable P, in the soils of both groups G1 and G2 were high and not limited to the production of cauliflower. Furthermore, the levels of Ca, Mg, and N accumulated in the different plant organs were in accordance with the levels described for the crop (Takeishi et al. 2009). Boron, although often associated with reduced severity of clubroot and increased crop yield (DIXON, 2009a; RUARO *et al.* 2009), did not show a relationship with a reduction in the disease in the present study. Boron levels were higher in samples with higher disease severity, in contrast to previous reports (WEBSTER and DIXON, 1991; DIXON, 1996; GOSSEN *et al.*, 2014). However, G1 and G2 had high and very similar mean B concentrations (Table 3).

One component relevant to the proper development of the plant and reduction in losses from clubroot may be related to the plant's ability to produce new roots and compensate for those infected by the pathogen. The limitation on the development of the plants, especially in G2, was probably due to the greater development of galls and the losses in the water and nutrient absorption capacity of the roots. These losses were compounded by the inhibition of the formation and development of new roots due to the low pH and high Al^{+3} content in the soil. The volume and, in particular, the percentage of healthy roots had an inverse relationship with the increased volume and percentage of roots with clubroot and direct relationships with the increase in pH and, consequently, the reduction in H+Al content in the soil (Fig. 1A, Fig. 3B). In other words, in the study of the relationship between clubroot and the development and production of the plant, the quantification of the healthy roots produced by the plant is as important as the quantification of the severity of roots affected by clubroot. Another important aspect to consider is the tendency of the cauliflower roots to have much greater horizontal than vertical growth (THORUP-KRISTENSEN and BOOGAARD 1998), exploring a wide range of the soil's superficial layers (0 to 20 cm of deep) in which there are also higher concentrations of resting spores of *P. brassicae* (DIXON 2009a). In the soils typical of the region (latosols and acrisols), the Al^{+3} content increases with soil depth and inhibits vertical root growth (chemical impediment) (MEURER *et al.* 2007), thus restricting the roots to the surface layers in which there is a higher probability of contact between roots and spores and, consequently, occurrence of infections.

Increased levels of soil OM have been reported to decrease the severity of clubroot, although conflicting results have been obtained (GOSSEN *et al.* 2013). However, in the present study, high levels of soil OM were observed (9.65 to 58.44 g/kg soil), with similar mean values for the two groups.

The results of this study confirm the close relationship between soil attributes (particularly acidity) and the severity of clubroot and losses in cauliflower. However, in addition to the pH, for tropical soils, one more variable can be added: Al^{+3} content. By chemically inhibiting root development, Al^{+3} may compromise the production and elongation of new roots that could compensate the loss of active roots caused by clubroot. The effects of Al^{+3} on roots might also contribute to the invasion and primary infection of root hairs by *P.*

brassicae. In other words, depending on the extent to which the acidity of the soil increases, the availability of Al^{+3} increases and restricts root development, thus increasing the potential for losses from the disease. Additionally, the predominant soils in the region have a high buffering capacity, which hinders the changes in pH up to the levels suggested for management of clubroot (≥ 7.2). This difficulty is aggravated in land with steep slopes, which limits the uniform incorporation of the limestone that is essential for avoiding outbreaks and failures in the management of the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank “National Council for Scientific and Technological Development” (CNPq) and “Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State” (FAPERJ) for financial support.

6. LITERATURE CITED

- ABREU, C. A. DE, ABREU, M. F., VAN RAIJ, B., BATAGLIA, O. C., AND ANDRADE, J. C. de. Extraction of boron from soil by microwave heating for ICP OES determination. **Comm. Soil Sci. Plant. Anal.** 25:3321-3333. 1994.
- CLUNE, T. S AND COPELAND, L. Effects of aluminium on canola roots. **Plant Soil** 216:27-33. 1999.
- DIXON, G. E. Repression of the morphogenesis of *Plasmodiophora brassicae* Wor. by boron - a review. **Acta Horticulture.** 407:393-401. 1996.
- DIXON, G. E. *Plasmodiophora brassicae* in its environment. **Journal Plant Growth Regulation.** 28:212-228. 2009a.
- DIXON, G. E. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. **Journal Plant Growth Regul.** 28:194-202. 2009b.
- DIXON, G. E. Clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) – an agricultural and biological challenge worldwide. **Canadian Journal Plant Pathology.** 36:5-18. 2014.
- DONAGEMMA, G.K, CAMPOS, D.V.B DE., CALDERANO, S.B., TEIXEIRA, W.G., AND VIANA J.H.M. **Manual e métodos de análise de solo.** 2nd ed. Embrapa solos, Rio de Janeiro, RJ. 2011.
- DONALD, C., AND PORTER, I. Integrated control of clubroot. **Journal Plant Growth Regul.** 28:289-303. 2009.
- ECHART, C. L AND CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural.** 31:531-541. 2001.
- FAO - Food and Agriculture Organization of The United Nations.. Economics and Statistics. Online: <http://www.fao.org>. 2006
- GOSSEN, B. D., DEORA, A., PENG, G., HWANG, S. F., AND MCDONALD, M. R. Effect of environmental parameters on clubroot development and the risk of pathogen spread. **Canadian Journal Plant Pathology.** 36:37-48. 2014.
- GOSSEN, B. D., MCDONALD, M. R., HWANG, S. F., STRELKOV, S. E., AND PENG, G. A comparison of clubroot development and management on canola and Brassica vegetables. **Canadian Journal Plant Pathology.** 35(2):175-191. 2013.
- GRISEL, P. N., AND ASSIS, R. L. 2012. Adoção de práticas agrícolas sustentáveis: estudo de caso de um sistema de produção hortícola familiar em ambiente de montanha. **Cad Ciênc. Tecnol.**29:133-158.

- GUERRA, J. G. M., LEAL, M. A. DE A. AND FERREIRA, M. B. C. **Recomendações de adubos e corretivos e de manejo da matéria orgânica para as principais culturas do Estado do Rio de Janeiro.** Pages 303-304 in: Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro. L. R. Freire, F. C. Balieiro, E. Zonta, L. H. C. dos Anjos, M. G. Pereira, E. Lima, J. G. M. Guerra, M. B. C. Ferreira, M. A. de A. Leal, D. V. B. de Campos and J. C. Polidoro, eds. Editora Universidade Rural, Seropédica. 2013.
- HAIR, J. F., ANDERSON, R.E., TATHAM, R.L. AND BLACK, W.C. **Análise multivariada de dados.** 5th ed. Bookman, Porto Alegre, RS. 2005.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Produção Agrícola Municipal (PAM). Online: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. 2006.
- MAY, A., TIVELLI, S. W., VARGAS, P. F., SAMRA, A. G., SACCONI, L.V., AND PINHEIRO, M. Q. **A cultura da couve-flor.** Boletim Técnico IAC, 200. Instituto Agrônômico, Campinas, SP. 2007.
- MEURER, E. J. **Fatores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas.** Pages 65-90 in: Fertilidade do solo. R. F. Novais, V., V. H. Alvarez, N. F. de Barros, R. L. F. Fontes, R. B. Cantarutti and J. C. L. Neves, eds. SBCS, Viçosa. 2007.
- MILLIGAN, G. W., AND COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of cluster in a data set. **Psychometrika.** 50:159-179. 1985.
- MURAKAMI, H., TSUSHIMA, S., AKIMOTO, T., AND SHISHIDO, Y. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology.** 49:584-589. 2000.
- NIST - National Institute of Standards and Technology. Standard Reference Materials 1573a Tomato Leaves. NIST, Gaithersburg, MD. 1995.
- NIWA, R., KUMEI, T., NOMURA, Y., YOSHIDA, S., OSAKI, M., AND EZAWA, T. Increase in soil pH due to Ca-rich organic matter application causes suppression of the clubroot disease of crucifers. **Soil Biology Biochemical.** 39:778-785. 2007.
- NIWA, R., NOMURA, Y., OSAKI, M., & EZAWA, T. Suppression of clubroot disease under neutral pH caused by inhibition of spore germination of *Plasmodiophora brassicae* in the rhizosphere. **Plant Pathology.** 57(3):445-452. 2008.
- RUARO, L., LIMA NETO, V. C., AND RIBEIRO JÚNIOR, P. J. Influência do boro, de fontes de nitrogênio e do pH do solo no controle de hérnia das crucíferas causada por *Plasmodiophora brassicae*. **Tropical Plant Pathology.** 34(4): 231-238. 2009.
- SHARMA, K., GOSSEN, B. D., AND MCDONALD, M. R. Effect of temperature on cortical infection by *Plasmodiophora brassicae* and clubroot severity. **Phytopathology.** 101:1424-1432. 2011.
- TAKAHASHI, L. M, CEBRIAN, I. T., AND SOUZA, N. L. Inoculação de *Plasmodiophora brassicae* agente causal da “hérnia das crucíferas”. **Summa Phytopathology.** 31:16-18. 2005.

TAKEISHI, J., CECÍLIO FILHO, A. B., AND OLIVEIRA P. R. Crescimento e acúmulo de nutrientes em couve-flor 'Verona'. **Bioscience**. 25:1-10. 2009.

THORUP-KRISTENSEN, K., AND BOOGAARD, R. Temporal and spatial root development of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.). **Plant Soil**. 201:37-47. 1998.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Method 3051 A Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. EPA, Washington, DC. 2007.

WALLENHAMMAR, A. C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oil seed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. **Plant Pathology**. 45:710-719. 1996.

WALLENHAMMAR A. C., JOHNSON L., AND GERHARDSON, B. Agronomic performance of partly clubroot-resistant spring oilseed turnip rape lines. **Journal Phytopathology**. 148, 495-9. 2000.

WEBSTER, M.A., AND DIXON, G.R. Boron, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. **Mycol. Res.** 95: 74-79. 1991.

YOUNG, C. C., CHENG, K. T., AND WALLER, G. R. Phenolic compounds in conducive and suppressive soils on clubroot disease of crucifers. **Soil Biology Biochemical**. 23:1183-1189. 1991.

CAPITULO II

Caracterização de unidades familiares em Nova Friburgo-RJ quanto ao manejo da couve-flor e da h ernia das crucíferas.

RESUMO

A h ernia das crucíferas, causada por *Plasmodiophora brassicae*, é a principal doença de diferentes espécies do g nero *Brassica*. Ocorre de forma generalizada em áreas de produção de couve-flor e as perdas causadas podem estar diretamente relacionadas às práticas de manejo dos solos e das culturas. O objetivo deste trabalho foi levantar aspectos e práticas adotadas por agricultores familiares, produtores de couve-flor, em Nova Friburgo-RJ e relacioná-las com a ocorrência da h ernia das crucíferas bem como fazer uma projeção para a ocorrência da doença na região. As informações foram coletadas no período de 19 a 30 de agosto de 2013 em 16 propriedades localizadas nas comunidades de Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande. Levantaram-se informações sobre as práticas de manejo adotadas e histórico de cultivo e coletaram-se amostras de solos para determinação de pH em água e determinação da concentração de esporo de resistência de *P. brassicae* no solo. Constatou-se que, a maioria dos produtores não adotam práticas simples e básicas para o controle da doença como rotação de culturas e correção da acidez do solo, nem adotam medidas preventivas visando limitar a dispersão do inóculo do patógeno. O quadro atual indica condição altamente favorável   ocorrência da doença em média a alta severidade em todas as propriedades investigadas decorrente dos baixos valores de pH ($4,5 < \text{pH} < 6,1$) e alta densidade de inóculo no solo ($> 2,58 \times 10^8$ esporos/g de solo). Quatorze propriedades foram diagnosticadas como com projeção para ocorrência mais severa da doença.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *botrytis*; *Plasmodiophora brassicae*; manejo.

7. INTRODUÇÃO

O município de Nova Friburgo está localizado na Região Serrana, no centro-norte do estado do Rio de Janeiro, próximo à Região Metropolitana, o que facilita o escoamento de sua produção. O clima da Região caracteriza-se por temperaturas médias anuais em torno de 18° C, médias no período de verão de 24° C e no período de inverno em torno de 13° C. As geadas são comuns, no inverno, especialmente nas várzeas, e as chuvas de granizo no verão (INMET, 2016).

A olericultura em Nova Friburgo caracteriza-se pela grande diversidade de produtos, com cultivo de mais de 50 espécies, com variedades distintas. Merece destaque pela importância na economia local e volume de produção, as culturas de couve-flor, tomate, salsa, repolho, brócolis e inhame. Esta produção está estruturada, em sua grande maioria, em unidades familiares e cultivos intensivos visando a obtenção de altos rendimentos. Como resultado, tem-se observado alguns problemas de ordem ambiental como erosão e escassez hídrica, e de ordem agrônômica como perdas por ataque de pragas e doenças e elevação de custos de produção pelo alto aporte de insumos, além de queda de rendimento das lavouras.

A couve-flor é, ao lado do tomateiro, a cultura de maior rentabilidade. Seu cultivo é praticado na região há mais de 50 anos com abastecimento do mercado da capital ao longo do ano. Entre as limitações à produção de couve-flor na região está a ocorrência de hérnia das crucíferas, causada por *Plasmodiophora brassicae*. Este patógeno causa galhas radiculares, resultante de hiperplasia das células, que chegam a atingir mais de um centímetro de diâmetro. À medida que a doença se desenvolve ocorrem prejuízos à absorção e translocação de água e nutrientes levando ao aparecimento de murchas, principalmente nas horas mais quentes do dia. Como consequência da infecção e colonização pelo patógeno, tem-se a redução do crescimento das plantas e queda de produção e qualidade da couve-flor (REIS *et al.* 2009). Devido à semelhança das galhas com tubérculos, a doença é localmente referida como batata da couve. Sua ocorrência se dá em reboleiras e é mais severa na safra de verão.

Dentre os principais fatores do solo que contribuem para o desenvolvimento da doença estão o pH e níveis de cálcio no solo (WEBSTER e DIXON, 1991; NIWA *et al.* 2008; DONALD e PORTER, 2009) e a distribuição, quantidade e viabilidade de esporos de resistência do patógeno no solo (RUARO *et al.* 2010; PENALBER, 2009; NARISAWA *et al.* 2005). Estudos demonstraram que pH alcalino influencia negativamente no processo de infecção e pode, inclusive, reduzir o número de infecções dos pelos radiculares (WEBSTER e DIXON, 1991). A doença é mais severa em solos com pH inferiores a 5,7, e tende a reduzir-se à medida em que o pH do solo se torna mais próximo da neutralidade (ZAMBOLIM, 2001; SCHUTA, 2003). Altos níveis de Ca no solo também contribuem para reduzir as infecções (DIXON, 2009). Concentrações muito altas de esporos de resistência no solo, superiores a 5×10^7 esporos.mL⁻¹ (SCHUTA, 2003), comprometem a eficiência de qualquer medida de controle, inclusive a elevação do pH e dos níveis de Ca no solo. A quantidade, viabilidade e distribuição dos esporos de resistência estão diretamente relacionados com frequência de cultivo de espécies hospedeiras (RASTAS *et al.* 2012) e práticas de preparo do solo.

Embora não existam estudos que tenham quantificado o impacto da hérnia das crucíferas sobre a produtividade, qualidade e retorno econômico na produção de couve-flor na região, relatos dos agricultores apontam para perdas de 40 a 60 % no rendimento da cultura, especialmente na safra de verão. No entanto, Dixon (2009b) relatou que, de forma geral, as perdas pela doença variam de 10-15%.

O presente trabalho teve como objetivo levantar dados sobre as principais práticas de manejo adotadas por produtores familiares de couve-flor no município de Nova Friburgo, RJ, para associar com a ocorrência da hérnia das crucíferas e fazer uma projeção de ocorrência da

doença em função de dois atributos, valores de pH e quantidade de esporos de resistência de *P. brassicae* no solo.

8. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em 16 unidades de produção familiar, com histórico de cultivo regular de couve-flor. Como critério, selecionaram-se unidades pertencentes às comunidades de Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande, localizadas no município de Nova Friburgo-RJ (-22° 17' 14''S e -42° 32' 01''W), que estavam com plantas de couve-flor em fase de colheita.

8.1. Levantamento de dados sobre as principais práticas de manejo adotadas por produtores familiares de couve-flor no município de Nova Friburgo, RJ.

Um questionário com 11 questões foi aplicado no período de 19 a 30 de agosto de 2013. Nesse, foram coletadas as seguintes informações: 1) tempo durante o qual se cultivava couve-flor na área; 2) cultivar plantada; 3) forma de preparo e manejo das mudas; 4) método de preparo do solo; 5) cuidados como a limpeza prévia das máquinas, implementos e ferramentas; 6) práticas de conservação de solo adotadas; 7) práticas adotadas para controle de plantas invasoras; 8) método e manejo de irrigação; 9) procedimentos utilizados na colheita; 10) destino e tipo de manejo adotado para os resíduos culturais; 11) informações sobre assistência técnica recebida nos últimos anos.

8.2. Determinação dos valores de pH e densidade de inóculo do patógeno nas áreas avaliadas e projeção para ocorrência da hérnia das crucíferas

Para se determinar a expectativa quanto à ocorrência e severidade da hérnia das crucíferas, coletaram-se de 6 a 16 amostras de solo de cada lote ou gleba plantado com couve-flor (Tabela 4 e Figura 5). As coletas de solos foram feitas na profundidade de 0 a 30 cm, em caminhamento em zig-zag do ponto mais alto para o mais baixo.

As amostras de solo foram homogeneizadas e separadas em duas partes, sendo a primeira para aferição do pH_(água) (DONAGEMMA *et al.* 2011) e a segunda, congelada para posterior contagem do número de esporos de resistência de *P. brassicae* (MURAKAMI *et al.* 2000a, modificado). Alíquotas de 1,0 g de solo foram suspensas em 50 mL de água destilada e autoclavada e agitadas por 5 min. Em seguida, ajustou-se o pH da suspensão para 10 utilizando-se NaOH a 1 mol/L, e submeteu-a novo ciclo de agitação por mais 5 min. Terminado o ciclo, reajustou-se o pH da suspensão para 9 com NaOH a 1 mol/L seguido de novo ciclo de agitação por mais 5 min. Peneirou-se a amostra em filtro formado por quatro camadas de tecido mousseline e, em seguida, centrifugou-se o filtrado a 2000 rpm por 10 min. O resíduo foi lavado com água destilada, centrifugado mais três vezes e, finalmente, ressuspensionado em 50 mL de água destilada. Para facilitar a visualização dos esporos, adicionaram-se 90 µL de azul de algodão a alíquotas de 400 µL da suspensão. Contabilizou-se o número de esporos de resistência em três amostras de cada suspensão com auxílio de Câmara de Neubauer e visualização em microscópio óptico na objetiva de 100X.

Tabela 4: Número de amostras retiradas em cada propriedade pertencentes nas comunidades de Serra nova, Serra velha e Rio grande, Nova Friburgo-RJ.

Propriedade	Área (m ²)	Comunidade	N ° de amostras
1	3920	Serra Nova	16
2	4900	Serra Nova	14
3	3185	Serra Nova	9
4	2940	Serra Nova	16
5	3600	Serra Nova	11
6	1980	Serra Velha	9
7	1800	Serra Velha	9
8	4320	Serra velha	12
9	1800	Serra velha	12
10	3920	Serra Velha	10
11	1440	Serra Velha	9
12	4320	Serra Velha	10
13	2520	Rio Grande	9
14	3600	Rio Grande	8
15	1715	Rio Grande	8
16	3600	Rio Grande	6
Total			168

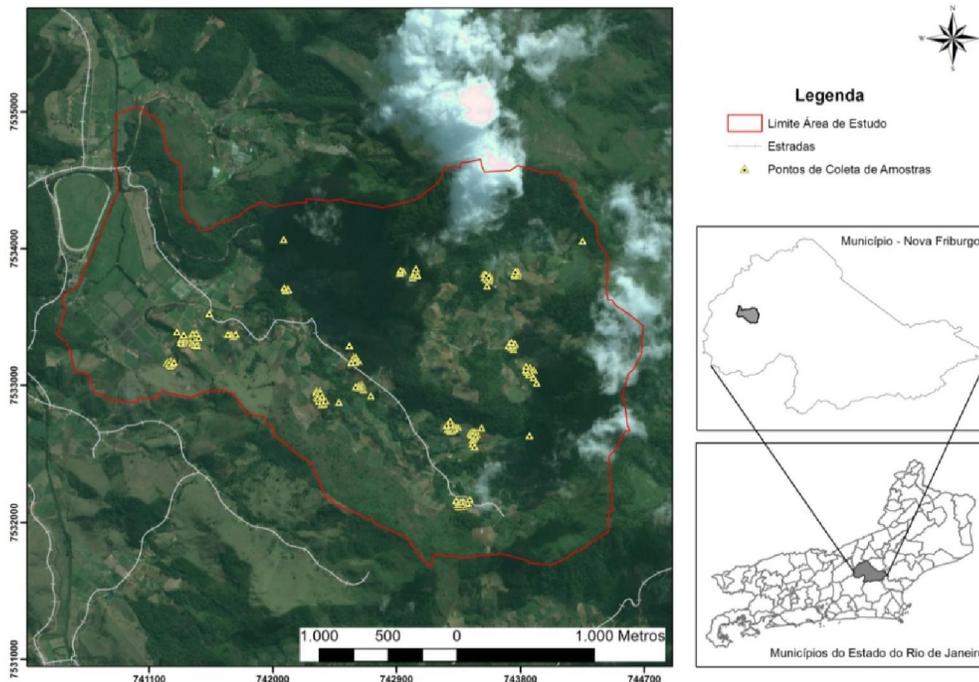


Figura 5. Mapa indicando os pontos de coletas das amostras (http://goto.arcgisonline.com/maps/World_Imagery). Fonte: Matos, 2017.

Após a leitura do pH_(água) e contagem do número de esporos de cada amostra, calcularam-se as médias por propriedade e posteriormente por comunidade. Os dados de pH e

número de esporos de resistência das 16 unidades foram submetidos à análise descritiva (média, desvio padrão, valor mínimo e máximo e coeficiente de variação). Os valores médios de pH encontrados por propriedade foram alocados em faixa de pH entre 4,0 a 6,5 de acordo com sua frequência de ocorrência e comparados aos descritos por Zambolim (2001) e Schuta (2003) quanto à expectativa de ocorrência da doença: pH < 5,7, condição altamente favorável à hérnia das crucíferas e expectativa de alta severidade da doença; pH > 5,7 e <6,6, condição medianamente favorável à doença e expectativa de severidade média a baixa; pH >6,6, condição pouco favorável à hérnia e estimativa de baixa severidade. Considerou-se, ainda a concentração de esporos de resistência do patógeno no solo, e as informações de Murakami *et al.* (2000b) e Narisawa *et al.* (2005) que propõem como condição muito favorável ocorrência da doença solos com concentração de esporos >10⁵ esporos/grama de solo e como condição desfavorável solos com < 10² esporos/grama de solo. Com base nestas duas informações foi proposta a classificação das propriedades em três categorias quanto à expectativa de intensidade de hérnia: alta severidade, média severidade e severidade baixa ou nula.

8.3. Severidade em escala de notas e índice de severidade na safra 2013 de couve-flor.

Para se determinar a severidade da hérnia das crucíferas, na safra de inverno de 2013, coletaram-se de 6 a 16 raízes de couve flor por propriedade, no mesmo local em que se retirou as amostras de solo. As raízes foram ensacadas e levadas para laboratório na UFRRJ, onde foram cuidadosamente lavadas e posteriormente fez-se a aferição da severidade em escala de notas de Takahashi *et al.* (2005), variando de 0 a 4 (0=0%, 1=25%, 2=50%, 3=75% e 4=100% de raízes contendo hérnia ou galhas), conforme a porcentagem da área radicular afetada. De posse das respectivas notas, efetuou-se o cálculo do Índice de Severidade (IS), com base na fórmula $IS = (1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) \times 100/4Nt$, onde n_1 ao n_4 é o número de plantas dentro das respectivas notas e Nt é o número de plantas testadas. Esses valores de índice de severidade foram classificados como: $IS \leq 25$ pode-se considerar que a planta é resistente, valores entre $25 \geq IS \leq 50$ pode-se considerar uma resistência intermediária e valores de $IS \geq 50$ considera-se que a cultivar é susceptível, já em relação aos isolados, considerou-se que $IA \leq 10$ baixa agressividade, $10 \geq IA \leq 40$ média agressividade e $IA \geq 40$ considerou-se o isolado como agressivo (STRELKOV *et al.*, 2007).

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. Principais práticas de manejo adotadas por produtores familiares de couve-flor no município de Nova Friburgo, RJ.

O cultivo de couve-flor na região é praticado há mais de 30 anos nas propriedades levantadas (Figura 7), e, atualmente, com o advento das cultivares de meia estação e de verão pode ser realizado praticamente o ano todo. A rotação de culturas não é praticada pela maioria dos produtores entrevistados. O intervalo entre um cultivo e outro de couve-flor na mesma área foi, em média, de sete meses. A rotação de culturas não é usual entre os pequenos produtores de hortaliças, pois estes, na maioria das vezes se especializam em algumas poucas culturas e, em geral, buscam otimizar o uso de suas áreas com o cultivo intensivo e sequenciado de hortaliças mais rentáveis (LIMA NETO *et al.* 2005). Muitos dos produtores da região estudada cultivam o tomateiro na primavera/verão e a couve-flor no outono/inverno (56,25 %). Em alguns poucos casos, cerca de 31,25%, cultivam milho ou aveia no verão e apenas 12,50% das propriedades relataram a prática de pousio antes de retornar com a couve-flor no inverno.

Este quadro contribui significativamente para a sobrevivência e multiplicação do inóculo do patógeno no solo, pois garante a presença do hospedeiro em diferentes estádios fenológicos ao longo do ano em diferentes áreas. Rastas *et al.* (2012) relatam que a frequência de cultivo de Canola e Nabo teve um efeito significativo sobre a incidência de hénria. Relatam, ainda, que o cultivo frequente de brássicas leva ao aumento da incidência de plantas infectadas e da severidade da doença e que este é o fator que mais afeta a severidade da hénria das crucíferas (RASTAS *et al.* 2012). Com base neste e em outros resultados, pode-se afirmar que a rotação de culturas com espécies não hospedeiras de *P. brassicae* durante longos períodos de tempo é uma das principais formas de controle da doença (FRIBERG *et al.* 2006). Ainda, alguns resultados indicam que algumas espécies em rotação poderiam contribuir mais que outras na redução das perdas pela hénria das crucíferas. Por exemplo, HASSE *et al.* (2007) citam redução significativa do potencial de inóculo de *P. brassicae* no solo pelo cultivo de salsinha (*Petroselinum hortense* Hoffm). O cultivo de rábano (*Brassica oleracea Gongylodes Group*), espinafre (*Spinacia oleracea*) e aveia comum (*Avena sativa*) antes do plantio de couve chinesa, favoreceu a germinação dos esporos de resistência de *P. brassicae* e contribuiu para reduzir a concentração de inóculo do patógeno no solo (MURAKAMI *et al.* 2000; MURAKAMI *et al.* 2001). Outras plantas como o alho porro (*Allium porrum*), centeio (*Secalle cereale*) e azevém (*Lolium perene*), embora sejam plantas não hospedeiras, também são citados como eficientes na redução do inóculo de *P. brassicae* no solo (FRIBERG *et al.* 2006).

Identificou-se que, na safra de inverno, os produtores utilizam basicamente duas variedades tradicionais de couve-flor, Bola de Neve (8 propriedades) e Teresópolis Gigante (7 propriedades), e sementes por eles colhidas (1 propriedade). O preparo das mudas é realizado, em sua maioria, por viveirista da região ou pelos próprios produtores, e em 14 propriedades das 16 entrevistadas usam bandejas de isopor, e apenas 2 propriedades relatam o uso de bandejas de plástico (Figura 7). As bandejas de isopor apesar de serem as mais usadas e de apresentar uma série de benefícios, tem como inconveniente a mais difícil higienização e eliminação de inóculo de patógenos. O sulfato de cobre e o hipoclorito de sódio são os produtos mais usados para higienização de bandejas. Inexistem, porém, informações sobre tempo e concentração mais indicados e eficiência destes produtos na descontaminação de bandejas (BRIGHENTI, 2010). Na Austrália, Donald *et al.* (2002) avaliaram vários produtos comerciais desinfetantes disponíveis no mercado e constataram que, com exceção de hipoclorito de sódio (1000 mg/L), todos foram ineficazes na eliminação de esporos de *P. brassicae*. Deve-se acrescentar, ainda,

que é prática rotineira entre os produtores colocar e deixar as bandejas com as mudas, assim que as recebe dos viveiristas, sobre o solo ao lado da área para onde serão transplantadas até o momento do transplante (Figura 6). Esta prática, pode favorecer a infecção precoce das plantas, antes do transplante, o que contribui para aumentar as perdas e para dispersar o patógeno na área. Embora não existam informações sobre a taxa de contaminação das mudas com esta prática, estima-se que esta pode ser bastante relevante visto o fato de os esporos de *P. brassicae* se concentrarem nos 5 cm superficiais do solo (DIXON 2009). Faggian *et al.* (1999) cita que a contaminação de bandejas de plástico deve-se na maioria das vezes a esta prática de se deixar as bandejas com mudas diretamente no solo antes do transplante.

Além do mais, este contato precoce das mudas com o patógeno pode contribuir para uma maior severidade e perdas pela doença uma vez que, *P. brassicae* pode infectar as plantas em seus diversos estágios de desenvolvimento e que, quanto mais cedo se inicia o processo de infecção, maiores são os danos (LIMA NETO *et al.* 2004; FRIBERG *et al.* 2005). Pesquisas indicam que plântulas de canola mais jovens são mais susceptíveis à infecção do que plântulas mais velhas (HWANG *et al.* 2011a) e que a infecção de plântulas jovens resulta em uma maior severidade da doença e plantas menores e de menor rendimento comparado à infecção de plantas mais velhas (HWANG *et al.* 2011a,b).



Figura 6: Bandejas com mudas de couve-flor depositadas diretamente em contato com o solo ao lado da área para onde as mudas serão transplantadas. Foto: Santos, C.A.2015.

Em todas as propriedades avaliadas, o plantio de couve-flor é realizado em áreas declivosas, sendo a maioria em covas ou em canteiros. Ainda, em nenhuma das propriedades foi relatado adoção de práticas de conservação de solo como plantio em curvas de nível, terraceamento ou canais escoadouros de água para reduzir e/ou evitar a erosão do solo. A não adoção destas práticas favorece as enxurradas e arraste de solo contaminado propiciando a fácil disseminação de esporos do *P. brassicae* para áreas mais baixas e contaminação de reservatórios de água.

Outro fator que pode agravar a ocorrência de *P. brassicae* nas propriedades, é o uso de implemento agrícola comunitário para o preparo do solo. Treze dos produtores entrevistados usam arado comunitário, sendo que apenas 1 produtor relatou fazer a limpeza prévia do equipamento (Figura 7). O problema é que um dos meios de disseminação do patógeno, é a utilização de implementos agrícolas contendo solo contaminado (CAO *et al.* 2009, GOSSEN *et al.* 2013b). Cao *et al.*(2009), citam que as máquinas e implementos agrícolas tem papel relevante na disseminação e no padrão de distribuição de plantas de canola infectadas por *P. Brassicae*. Hwang *et al.* (2014) e Gossen *et al.* (2015) relatam que os esporos de solo infestado,

carregado por máquinas agrícolas, foi o principal mecanismo de disseminação de patógenos dentro e entre os campos no oeste do Canadá.

Apesar de ser difícil a completa eliminação de estruturas do patógeno de grande parte dos equipamentos agrícolas, por ser um processo demorado e não rotineiro dos produtores (HWANG *et al.* 2013), esta prática deve ser incentivada. A limpeza de equipamentos antes do uso em uma área livre de hémnia, representa uma medida importante e que pode ao menos reduzir a dispersão do patógeno (GOSSEN *et al.* 2014).

Outra falha recorrente no manejo refere-se a não observação de umas das medidas mais importantes no controle da doença que é a correção da acidez do solo. Dez produtores afirmaram nunca terem feito análise química de solo e apenas 1 fez análise do solo para planejar a adubação da couve-flor. Ainda, 8 dos produtores entrevistados informaram fazer a calagem anualmente antes do plantio de tomate, porém de forma empírica ou sem critério. Este comportamento deve-se, provavelmente, ao fato de o tomate ser uma cultura mais rentável que a couve-flor e de responder negativamente em solos ácidos e com baixos níveis de Ca pela produção de frutos com podridão apical. Esta anomalia é bastante conhecida pelos produtores assim como a sua associação com carência de Ca. Somente 2 dos produtores realizam calagem visando o cultivo de couve-flor. Esta falta de preocupação com a avaliação e correção da acidez do solo, provavelmente, se deve ao fato de desconhecem que a cultura é altamente exigente em cálcio e magnésio, que produz melhor em solos com pH entre 6,0 e 6,8, (MAY *et al.* 2007) e que a correção da acidez e elevação dos níveis de Ca é essencial no manejo da hémnia das crucíferas (WEBSTER e DIXON 1991; DIXON, 2009).

Por outro lado, mesmo sem critérios norteadores, aplicam grandes quantidades de fertilizantes, em especial os nitrogenados na forma de ureia, para obterem altos rendimentos. Sabe-se que a fonte, amônio ou nitrato, e a quantidade de nitrogênio utilizada também pode afetar a ocorrência de doenças (HUBER e THOMPSON 2007). Quando o processo de nitrificação converte o íon amônio a nitrato, íons hidrogênio são liberados. Isto é uma fonte de acidez para o solo. Consequentemente, as fontes de nitrogênio que contêm ou formam nitrogênio amoniacal aumentam a acidez do solo (Instituto da Potassa e Fosfato, 1998), apresentando efeitos diretos sobre a germinação, sobrevivência, reprodução, crescimento e virulência do patógeno, sendo a hémnia das crucíferas favorecida pelo pH baixo (MARINGONI, 1997).

Praticamente todos os entrevistados irrigam a couve-flor por aspersão de água coletada em nascentes e assim, provavelmente, a água não é fonte de contaminação das áreas. Todos os produtores controlam as plantas invasoras com herbicidas aplicados antes do transplante e 1 a 2 capinas ao longo do ciclo. Apesar da ausência de trabalho que comprove, existe a suspeita de que as capinas possam aumentar a severidade da doença, por prejudicar, através de ferimentos, o sistema radicular sadio. As plantas de couve-flor caracterizam-se pela intensa ramificação e produção de pelos radiculares nas camadas superficiais (THORUP-KRISTENSEN e BOOGAARD 1998) e pode ser bem afetada pela realização de capinas.

As inflorescências são colhidas, envoltas pelas próprias folhas e embaladas em caixa K, ou a granel, e comercializadas diretamente por atravessadores que as buscam nas propriedades e levam para a CEASA-RJ. Os resíduos culturais, folhas basais, plantas não colhidas e raízes são deixadas no solo e posteriormente incorporadas por ocasião do preparo do solo para o próximo plantio. Esta prática é localmente fomentada sob o argumento de estar contribuindo para o aporte de matéria orgânica ao solo. No entanto, as galhas contendo os esporos de resistência do patógeno são, dessa forma, redistribuídas no solo contribuindo para o aumento e dispersão do inóculo a cada ciclo da cultura. As galhas são quebradiças, o que favorece a disseminação da doença com o revolvimento do solo. O arranquio e a destruição das raízes com galhas poderiam ser uma forma de amenizar substancialmente os problemas com a

doença e é uma prática que merece ser avaliada na região, visto serem propriedades pequenas. A adoção dessa prática na lavoura poderia reduzir a severidade da doença nos ciclos seguinte. De acordo com Hasse *et al.* (2007), o manejo inadequado, principalmente dos restos culturais contaminados que são deixados no solo, ou incorporados, associado com o tempo de sobrevivência dos esporos, cerca de oito a dez anos (SCHUTA, 2003; FRIBERG *et al.*, 2005; HASSE *et al.*, 2007), são as principais dificuldades na diminuição do potencial de inóculo do patógeno no solo.

Muitos dos produtores relataram não receber assistência técnica de órgão público oficial e, que quando recebem, 7 produtores, são representantes de lojas agropecuárias (Privada), em sua maioria localizada nas proximidades e no entreposto do CEASA localizado na região (Figura 7). Segundo informações obtidas por Mendes e Guerra (2010), em estudo sobre agricultura familiar e desenvolvimento rural sustentável em Nova Friburgo-RJ, no período de 2002 a 2010 não havia parceria formal entre EMATER-Rio e a Secretária de Agricultura da Prefeitura de Nova Friburgo. Esta ausência do poder público na prestação de assistência técnica pode explicar boa parte dos problemas encontrados nas práticas de manejo e conservação de solo e na não adoção de medidas preventivas no manejo da doença.

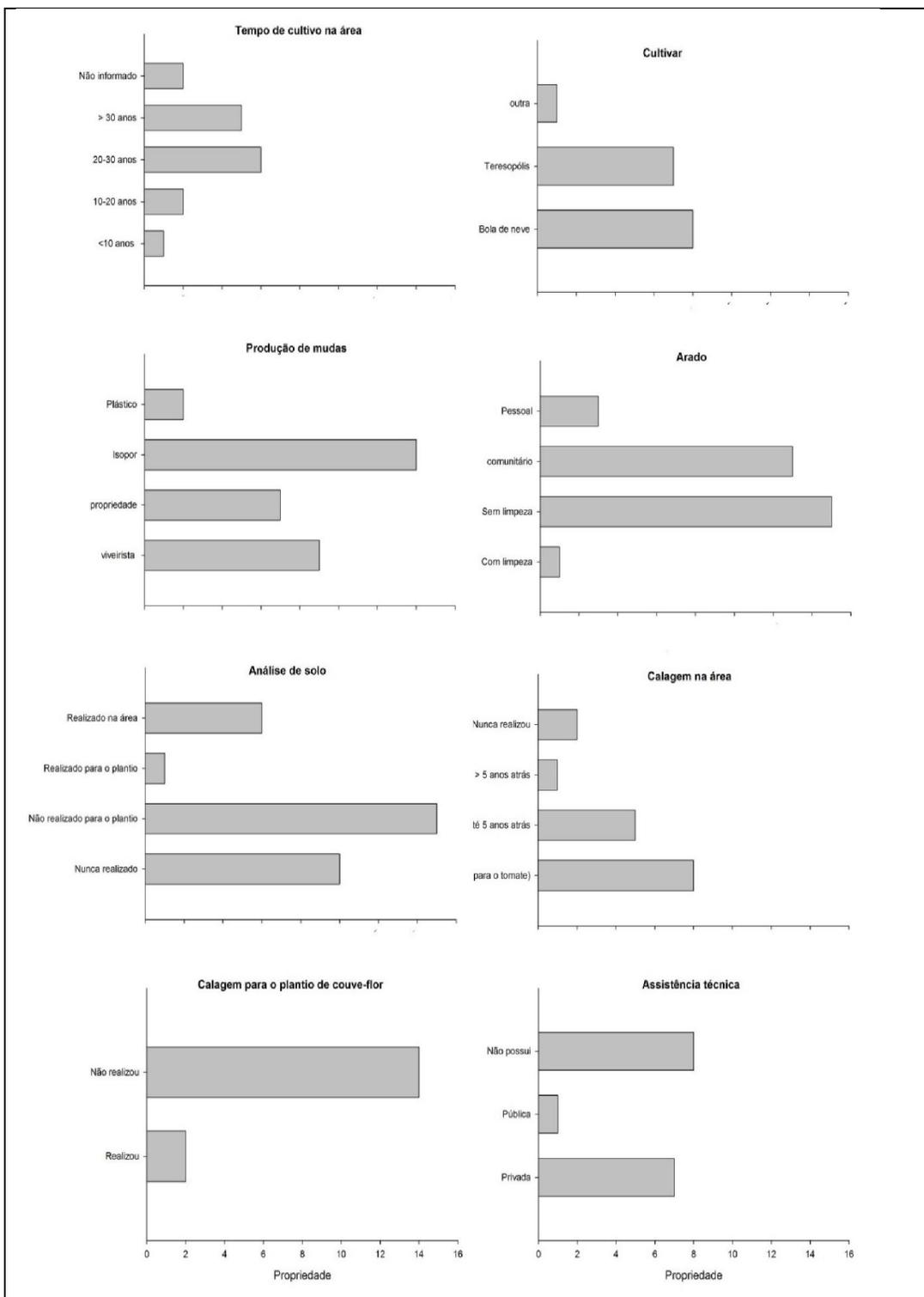


Figura 7: Características e práticas de manejo adotadas em lavouras de couve-flor nas unidades familiares amostradas mostrando desde o histórico de cultivo de couve-flor na área à práticas de manejo de solo. Dados obtidos em 16 unidades familiares de Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande no município de Nova Friburgo, RJ. Setembro de 2013.

9.2. Valores de pH e densidade de inóculo do patógeno nas áreas avaliadas e projeção para ocorrência da hérnia das crucíferas

Os valores de $pH_{(água)}$ nas 168 amostras analisadas variaram de 4,2 a 6,4, com acentuado predomínio de solos ácidos (Figura 4). As médias de pH por comunidade foram iguais a 5,12, 5,11 e 5,49 em Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande, respectivamente (Tabela 5). As análises indicaram também que as propriedades pertencentes à mesma comunidade apresentaram boa homogeneidade quanto aos valores de pH do solo, com coeficientes de variação entre 5,47 e 10,33%.

Constatou-se ocorrência de hérnia das crucíferas em todas as áreas avaliadas, bem como alta densidade de esporos de resistência de *P. brassicae* - cerca de $1,98 \times 10^9$ esporos/grama de solo em Serra Nova, $2,15 \times 10^9$ em Serra Velha e $3,81 \times 10^9$ em Rio Grande (Tabela 5). Para esta variável, observou-se elevado coeficiente de variação, devido provavelmente ao fato de a doença ocorrer em reboleiras, e as dificuldades relacionadas à metodologia de extração e contagem de esporos.

A estimativa dos níveis de infestação nos campos leva em consideração a densidade da população do patógeno e as frequências de infecções (SAMUEL E GARRETT, 1945). Naiki *et al.* (1978) relataram, no entanto, que nenhuma infecção ocorreu quando havia menos de 10^3 esporos de resistência/g de solo. Porém, elevado potencial de inóculo pode comprometer a eficiência de práticas de manejo da doença.

Murakami *et al.* (2000b) relatam baixa severidade da hérnia em solos com concentração de esporos equivalente a 10^4 até 10^5 esporos/g de solo, e alta severidade em solos com concentração acima de 10^6 esporos/g de solos. Narisawa *et al.* (2005) relatam que o uso de *Heterconium chaetospora* como agente de biocontrole da doença somente foi efetivo quando a densidade de esporos de resistência de *P. brassicae* foi de até 10^5 esporos/g de solo. Penalber (2009) relatou com base em experimentos conduzidos em campo com brócolis, que sob a alta concentração de esporos, 10^8 esporos/g de solo, nenhum dos compostos orgânicos estudados teve efeito na redução da severidade da doença.

Tabela 5: Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de pH e número de esporos no solo de cada comunidade.

	Serra Nova		Serra velha		Rio Grande	
	pH	Número de esporos*	pH	Número de esporos	pH	Número de esporos*
Média	5,12	1,98E+09	5,11	2,15E+09	5,49	3,81E+09
Desvio padrão	0,53	3,01E+09	0,31	3,55E+09	0,3	2,74E+09
Mínimo	4,61	2,93E+08	4,71	3,17E+08	5,2	2,58E+08
Máximo	5,98	7,27E+09	5,56	1,01E+10	5,85	6,91E+09

*esporos/grama de solo

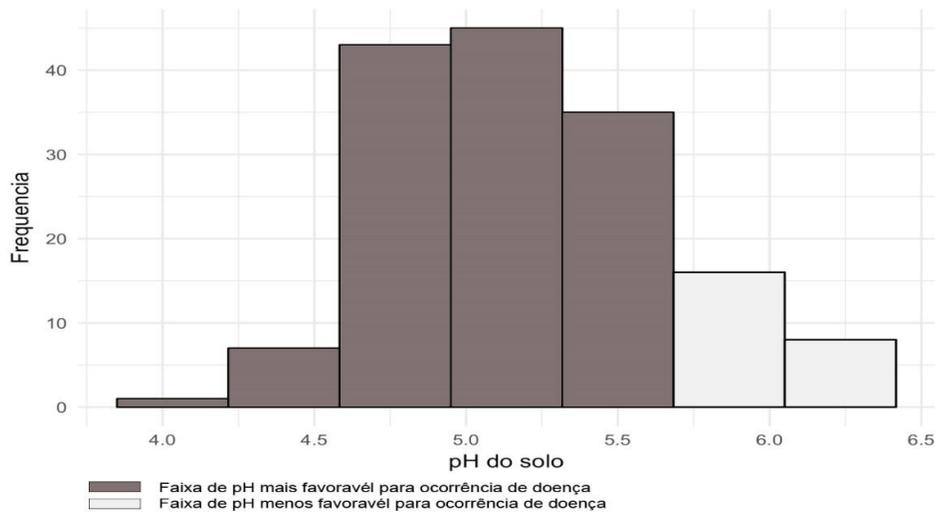


Figura 8 – Distribuição de frequência de solos com valores médios de $\text{pH}_{(\text{água})}$ nas três comunidades Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande do município de Nova Friburgo-RJ. Safra de inverno de 2013. Dados de 168 amostras de solo. pH favoráveis à doença: $\text{pH} < 5,7$, altamente favorável e expectativa de alta severidade; pH variando de 5,7 a 6,6, severidade intermediária, $\text{pH} > 6,6$, pouco favorável à hérnia e estimativa de baixa severidade.

Com base nos dados de pH e nos de densidade de esporos do patógeno nos solos das 16 áreas investigadas e, tendo como base as informações sobre a relação entre pH e ocorrência da doença (ZAMBOLIM, 2001; SCHUTA, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2009) e entre concentração de esporos do patógeno no solo e severidade da doença (MURAKAMI *et al.* 2000; NARIWASA *et al.* 2005), construiu-se o gráfico apresentado na Figura 8. Estes autores relatam que pH menor que 5,7 e número de esporos de resistência maior que 10^5 por grama de solo caracterizam áreas muito favoráveis ao desenvolvimento da hérnia das crucíferas. Com base nestes dados e nestas informações pode-se estimar que a expectativa para a ocorrência da hérnia das crucíferas varia de média a alta severidade em todas as propriedades investigadas. Destas, 14 áreas caracterizam-se como sendo altamente vulneráveis e com expectativa para ocorrência da doença em alta severidade, por apresentarem $\text{pH} < 5,7$ e densidade de esporos $> 10^5$ ($\log > 5$) por grama de solo (Figura 9).

Este quadro crítico reflete uma soma de eventos e variáveis que levam a um ambiente propício à ocorrência e desenvolvimento da doença como: longo histórico de cultivo de *Brassica spp.*, em especial de couve-flor, a não adoção de medidas que possam reprimir o acúmulo e dispersão do inóculo entre as propriedades e dentro da própria área, o cultivo regular de couve-flor sem um programa de rotação e o baixo pH do solo. Outras variáveis, não mensuradas, também podem interferir no desenvolvimento da doença como umidade do solo, temperatura, e atividade microbiana do solo (DIXON 2009b). Este quadro é similar ao relatado por Araújo *et al.* (2009) para o município de Curitiba, PR.

Diante destes resultados e das informações disponíveis sobre o manejo da hérnia, acredita-se que a redução das perdas pela doença na região somente serão possíveis a partir de implementação de pelo menos duas práticas: a) rotação de culturas com espécies não hospedeiras e aumento do intervalo entre um cultivo e outro de Brassica visando reduzir o alto potencial de inóculo hoje existentes na região; b) correção da acidez do solo com a aplicação de corretivos de acidez embasada em análise prévia de solo e cálculo da dose a ser aplicada, visando tornar o ambiente menos propício ao desenvolvimento da doença. Além destas, outras medidas também devem ser difundidas como o manejo correto das bandejas de mudas, o

arranquio e destruição de raízes infectadas, pelo menos nas áreas de reboleiras, redução do revolvimento do solo, limpeza dos implementos agrícolas, adoção de práticas de conservação visando reduzir o arraste de solo contaminado por meio da erosão e/ou por enxurrada.

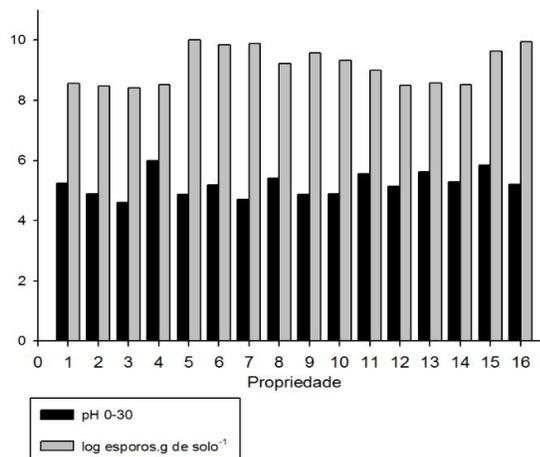


Figura 9 – Severidade estimada da h ernia das crucíferas considerando os valores observados de pH( gua) e o número de esporos de resistência de *P. brassicae* (Logaritmo) em amostras de solo coletadas em 16 propriedades de Nova Friburgo-RJ, na safra de inverno de 2013.

9.3. Severidade em escala de notas e  ndice de severidade na safra 2013 de couve-flor.

Na safra de 2013 foi detectado a ocorrência da doença em todas propriedades e conseqüentemente em todas as comunidades produtoras de couve-flor. A severidade em escala de notas foi de 2,75 em Serra Velha, 2,67 Serra Velha e 2,96 Rio grande (Tabela 6), o que significa que as raízes de couve flor, possuíam mais de 50% de suas raízes afetadas pelas h ernias das crucíferas. Este resultado pode ser considerado como sendo média a alta severidade, e confirma estimacão quanto a expectativa para a ocorrência da h ernia das crucíferas em todas as propriedades investigadas. E o  ndice de severidade foi maior que 50% em todos os casos, indicando que as plantas cultivadas na safra de inverno nas 3 comunidades são suscetíveis as raças de *P. brassicae* presente nos solos de Friburgo.

Tabela 6: Severidade em escala de notas e índice de severidade da Hérnia das crucíferas, no cultivo de inverno de couve-flor, safra de 2013.

Severidade em escala de notas			
	Serra Velha	Serra nova	Rio Grande
Média	2,75	2,67	2,963
Desvio padrão	0,76	0,85	0,81
Mínimo	0	1	1
Máximo	4	4	4
Índice de severidade (%)			
Serra Velha	68,94		
Serra nova	66,9		
Rio Grande	73,98		

10. CONCLUSÕES

1. Práticas de manejo adotadas pela maioria dos produtores da região como contínuo revolvimento do solo, uso de implemento agrícola partilhado, sem limpeza prévia e a falta de correção de acidez do solo, contribuem para a ocorrência generalizada da doença;

2. Nas condições atuais, a área investigada tem alta propensão à ocorrência da hérnia das crucíferas, e em média a alta severidade;

3. Entre as medidas prioritárias a serem recomendadas na região para se reduzir as perdas pela doença estão a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, o aumento do intervalo entre o cultivo de *Brassica* sp. na mesma área e, a correção da acidez do solo;

11. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M.A.; SOUZA, J.L.M.; LIMA NETO, V.C.; BRONDANI, B.E. Estimativa da incidência e severidade da hérnia das crucíferas em função do pH do solo. **Scientia agraria**, v.10, n.6, p.499-505, 2009.
- BRIGHENTI, J. **Desinfecção de bandejas e uso de substratos agrícolas na produção de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.) na região oeste catarinense**. Monografia. Unochapecó. Chapecó-SC.2010.
- CAO T, MANOLII VP, HWANG SF, HOWARD RJ, STRELKOV SE. Virulence and spread of *Plasmodiophora brassicae* [clubroot] in Alberta, Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**. 31:321–329. 2009.
- DIXON, G.R. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. **Journal Plant of Growth Regulation**, 28:194–202, 2009a.
- DIXON, G. R. *Plasmodiophora brassicae* in its environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, 28(3): 212-228, 2009b.
- DONAGEMA, G. K, CAMPOS, D. V. B DE., CALDERANO, S. B., TEIXEIRA, W. G., and Viana J.H.M. **Manual e métodos de análise de solo**. Embrapa solos. 230 p. 2011.
- DONALD, C. & PORTER, I. Integrated control of clubroot. **Journal Plant of Growth Regulation**, 28:289–303, 2009.
- DONALD EC, LAWRENCE JM, PORTER IJ. Evaluation of a fluorescent staining technique as an indicator of pathogenicity of resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. **Australasian Plant Pathology** 31:373–379. 2002.
- FAGGIAN R, DONALD C, PORTER IJ, LAWRIE AC. Epidemiology of recent clubroot outbreaks using PCR to trace sources of inoculum. **Australasian Plant Pathology Society** 12th biennial conference, Canberra, p 342.1999.
- FRIBERG, H., LAGERLÖF, J., & RÄMERT, B. Germination of *Plasmodiophora brassicae* resting spores stimulated by a non-host plant. **European Journal Plant Pathology**, 113, 275–281. 2005.
- FRIBERG, H., LAGERLOF, J., RAMERT, B. Usefulness of nonhost plants in managing *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, v. 55, p. 690– 695, 2006.
- GOSSEN, B. D., STRELKOV, S. E., MANOLII, V. P., CAO, T., HWANG, S.F.,PENG,G.,&MCDONALD,M.R. Spread of clubroot on canola in Canada, 2003–2014. Old pathogen, new home. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 37, 403–413. 2015.
- GOSSEN B.D., DEORA A., PENG G., HWANG S. E MCDONALD M.R.; Effect of environmental parameters on clubroot development and the risk of pathogen spread. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 36:sup1, 37-48. 2014.

GOSSEN BD, MCDONALD MR, HWANG SF, STRELKOV SE, PENG, G. Comparison of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) development and management on canola and Brassica vegetables. **Canadian Journal of Plant Pathology**. 35:175–191.2013.

HARDING, M.W., HOWARD, R.J., NEESER, C., STRELKOV, S.E., TEWARI, J.P., LISOWSKI, S.L.I., SLOMP, D.L., XUE, S., & SPENCER, R.C.J. Incidence of clubroot on cruciferous vegetables in Alberta in 2004. **Canadian Plant Disease**. Surv., 85, 98–99. 2005.

HASSE, I., MAY DE MIO, L. L., LIMA NETO, V. C. Efeito do pré-plantio com plantas medicinais e aromáticas no controle de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 74-79, 2007.

HASSE, I. **Quantificação de *Plasmodiophora brassicae* uso de plantas medicinais para controle da doença**. 96f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal do Paraná. Curitiba.2005.

HWANG, S. F., HOWARD, R. J., STRELKOV, S. E., GOSSEN, B. D., &PENG, G. Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 36,49–65. 2014.

HWANG, S. F., AHMED, H. U., ZHOU, Q., RASHID, A., STRELKOV, S. E., GOSSEN, B. D., G. PENG & TURNBULL, G. D. Effect of susceptible and resistant canola plants on *Plasmodiophora brassicae* resting spore populations in the soil. **Plant pathology**, 62(2), 404-412. 2013.

HWANG, S. F. et al. Influence of cultivar resistance and inoculum density on root hair infection of canola (*Brassica napus*) by *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, v. 60, n. 5, p. 820-829, 2011a.

HWANG, S. F. et al. Seedling age and inoculum density affect clubroot severity and seed yield in canola. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 183-190, 2011b.

HUBER DM, THOMPSON LA. Nitrogen and plant disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (Eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul MN. APS Press. pp. 31-44. 2007.

INMET-Instituto Nacional de Meteorologia. <http://www.inmet.gov.br>. Acessado em dezembro de 2016.

LIMA NETO, V. da C.; LIMA; M.L.R.Z. da C.; SCHUTA, L.R.; NOWACKI, J. de C.; PASQUALIN, D. **Projeto Galha das Crucíferas. Relatório apresentado à Secretaria de Agricultura e do Abastecimento do Paraná**. Programa Paraná 12 meses, 86 p. 2005.

LIMA NETO, V. C. et al. **Manual de controle da galha das crucíferas**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná (UFPR)/Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB)-Programa Paraná 12 meses, 86 p. 2004.

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

MAY, A., TIVELLI, S. W., VARGAS, P. F., SAMRA, A. G., SACCONI, L.V., AND PINHEIRO, M. Q. 2007. **A cultura da couve-flor**. Boletim Técnico IAC. Online:[http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes_online/p\(df/Tecnico200.pdf\)](http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes_online/p(df/Tecnico200.pdf))

MENDES, F.C. & GUEDES, C.A.M. **Agricultura familiar e desenvolvimento rural sustentável em Nova Friburgo-RJ**. In XI Seminario Internacional de la Red Iberoamericana de Investigadores sobre Globalización y Territorio (RII), Mendoza, Argentina, 2010. Disponível em: http://institucifot.com/seminario_rii/pdfs/grupo1/01.22-Coelho%20Mendes.pdf Acesso em 28 de janeiro de 2016.

MURAKAMI, H.; TSUSHIMA, S.; AKIMOTO, T.; MURAKAMI, K.; GOTO, I.; SISHIDO, Y. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology**, v. 49, n. 5, p. 584-589, 2000a.

MURAKAMI, H.; TSUSHIMA, S., SHISHIDO, Y. Soil suppressiveness to clubroot disease of Chinese cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32,1637-1642,2000b.

NARISAWA, K.; SHIMURA, M.; USUKU, F.; FUJUHARA, S.; HASHIBA, T. Effects of pathogen density, soil moisture and soil pH on biological control of clubroot in chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. **Plant Disease**. V.89, 285-290, 2005.

NIWA, R.; NOMURA, Y.; OSAKI, M; EZAWA, T. Suppression of clubroot disease under neutral pH caused by inhibition of spore germination of *Plasmodiophora brassicae* in the rhizosphere. **Plant Pathology**, v. 57, 445-452, 2008.

PENALBER, A.T.T. **Controle alternativo da hérnia das crucíferas causada por *Plasmodiophora brassicae* em brócolis através de compostos orgânicos**. 168p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

RASTAS, MARIKA, SATU LATVALA, AND ASKO HANNUKKALA. "Occurrence of *Plasmodiophora brassicae* in Finnish turnip rape and oilseed rape fields." **Agricultural and Food Science** 21.2: 141-158.2012.

REIS, A. **Hérnia das crucíferas**. Comunicado Técnico, nº 72, Embrapa Hortaliças, Brasília, 2009.

ROSA, D. D.; BASSETO, M. A.; FURTADO, E. L.; Efeito da temperatura sobre a severidade de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p.240-243, 2010.

RUARO, L., LIMA NETO, V.C.; MOTTA, A.C.V. Efeito do pH do solo em diferentes níveis de inóculo no controle de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.16-20, 2010.

SCHUTA, L. R. **Boro, nitrogênio, concentração de inóculo e pH no controle da *Plasmodiophora brassicae***. 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia -Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

THORUP-KRISTENSEN, K., e BOOGAARD, R. Temporal and spatial root development of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.). **Plant and Soil**, 201: 37-47. 1998.

VIDAL, M. C. **Efecto de la asociación de plantas aromáticas con *Brassicas* spp. en el control de la hernia de las crucíferas (*Plasmodiophora brassicae* Woron.)**. 2010. 152 f. Tese (Doutorado Agroecología, Sociología y Desarrollo Rural Sostenible) – Instituto de Sociología y Estudios Campesinos, Universidade de Córdoba, Espanha. 2010.

WEBSTER, M. A. & DIXON, G. R. Calcium, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. **Mycological Research**, 95(1): 64-73, 1991.

ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado da fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 722 p.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; LUZ, W. C. **Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas**. Revisão anual de patologia de plantas, v. 1, p. 275-318, 1993.

CAPÍTULO III

RELAÇÃO ENTRE ATRIBUTOS FÍSICOS, QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DO SOLO E OCORRÊNCIA DE HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS EM ÁREAS DE CULTIVO DE COUVE-FLOR

RESUMO

A h ernia das crucíferas tem ocorrência em regiões produtoras de brássicas, como Nova Friburgo-RJ, e é favorecida por pH do solo ácido, baixo teor de cálcio e boro. Assim, características físicas e químicas do solo, e as práticas de manejo adotadas podem afetar a h ernia das crucíferas, e também popula o microbiana do solo. Portanto, realizou-se o presente trabalho com objetivo de investigar as rela es existentes entre características físicas e químicas do solo, diversidade bacteriana e intensidade da h ernia das crucíferas (*Plasmodiophora brassicae*) em áreas de cultivos de couve-flor no município de Nova Friburgo-RJ. Coletaram-se 17 amostras de solo e plantas em 10 propriedades familiares com histórico de cultivo regular de couve-flor há mais de 30 anos e ocorrência de h ernia das crucíferas. As amostras foram colhidas em agosto de 2013, em lavouras em fase de colheita. As amostras de solo foram processadas e submetidas a análises química e física dos solos e, as de planta,   quantifica o da intensidade da h ernia das crucíferas. Avaliou-se, ainda, a diversidade bacteriana com base na técnica de DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante). Os dados obtidos foram submetidos a análises agrupamento e de componentes principais. Baseado na análise da diversidade bacteriana, as amostras foram divididas em dois grupos: G1, que se caracterizou por maiores valores de pH, Ca, Mg, SB, B, N, maior teor de areia, maior volume de raízes com h ernia (VolH), sadias (VolS) e total (Vot), maior porcentagem de raízes sadias (PRS) em enores valores de P e K, Al e H+Al, m teria orgânica (MO), CTC, silte e argila, menor número de bandas (UTOs- Unidades Taxonômicas Operacionais) de bactérias, menor severidade, porcentagem de raízes com h ernia (PRH) e número de esporos de resistência do patógeno no solo. O grupo 2 (G2) destacou-se pelos maiores valores de P, K, Al, H+Al, MO, CTC, maiores teores de silte e argila, maior número de bandas (UTOs) de bactérias, maior severidade da h ernia porcentagem de raízes com h ernia e número de esporos do patógenos. Observou neste trabalho que a intensidade da h ernia das crucíferas e a diversidade bacteriana não foram correlacionadas; A m teria orgânica e a disponibilidade de fósforo e potássio foram os fatores de solo que mais influenciaram positivamente a diversidade bacteriana.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *botrytis*; *Plasmodiophora brassicae*; m teria orgânica.

12. INTRODUÇÃO

A h ernia das crucíferas   uma doença causada por *Plasmodiophora brassicae*, protozoário habitante do solo e fitoparasita obrigatório. O patógeno infecta as raízes de várias espécies de brássicas e causa grandes perdas de produção (NARISAWA *et al.* 2005; NIWA *et al.* 2008; PENG *et al.* 2011). O sintoma t pico da doença é a formação de galhas ou hérnias nas raízes que reduzem o sistema radicular e, conseqüentemente, a absorção de água e de nutrientes pelas plantas. Em casos mais severos pode levar à morte das plantas (KONG KAW WA, 2009; PENALBER, 2009).

A h ernia das crucíferas tem ocorrência generalizada em diferentes áreas onde se cultiva brássicas no mundo. No Brasil, ocorre principalmente nas regiões Sul e Sudeste e tem inviabilizado o cultivo de brássicas em várias áreas. A ausência de cultivares de couve-flor resistente   doença, do controle químico ser ainda restrito a um único princípio ativo, a ciazofamida (AGROFIT, 2016), aliado à capacidade do patógeno sobreviver por 3 a 6 anos no solo sem a presença de hospedeiro (WALLENHAMMAR 1996), com relatos, porém, de sobrevivência por até vinte anos (DIXON 2009), dificultam o manejo da doença. Em Nova Friburgo, RJ, o cultivo intensivo e contínuo de couve-flor ao longo de vários anos tem levado ao aumento das perdas pela doença e inviabilizado diversas áreas para o seu cultivo, especialmente no período de verão.

As infecções pelo patógeno e a severidade da doença estão diretamente relacionadas a diferentes fatores como potencial de inóculo do patógeno no solo, temperatura e umidade do solo, e características físicas, químicas e biológicas do solo (DONALD e POTER 2009; DIXON 2009; SHARMA *et al.* 2011; GOSSEN *et al.* 2014). Estas afetam não são o patógeno como também a planta e o desenvolvimento da doença. Esses diferentes atributos são interligados e, alterações no balanço dos mesmos podem levar a um maior ou menor desenvolvimento de doenças radiculares em geral (WHEELER e RUSH, 2001), incluindo, a h ernia das crucíferas.

As características físicas e químicas do solo, a matéria orgânica e as práticas de manejo adotadas por sua vez, além de afetar a h ernia das crucíferas, também afetam população microbiana do solo. Ainda, podem interferir na supressividade de forma direta, por meio de favorecimento da atividade microbiana ou indiretamente, quando interferem no ciclo de vida do patógeno. As principais propriedades do solo envolvidas na supressividade são: teor de matéria orgânica, pH, macro e micronutrientes, estrutura e textura, tipo de argila, retenção de água e condutividade elétrica, entre outras (LAZAROVITIS *et al.* 2001; 2006; ABASSI *et al.* 2006; GHINI *et al.* 2007).

O pH e os teores de cálcio no solo são, sabidamente, fatores determinantes no manejo da h ernia das crucíferas (DIXON 2014). Altos níveis de matéria orgânica no solo também têm sido associados à supressividade e redução de perdas pela h ernia, porém, com relatos divergentes (DIXON 2014, GOSSEN *et al.* 2013). Outros fatores relacionados às características do solo, como quantidade de inóculo (MACFARLANE, 1952), umidade (GOSSEN *et al.* 2012; KASINATHAN, 2012, RASTAS *et al.* 2012), textura do solo, e práticas de manejo adotadas (frequência e intensidade de cultivo de espécies hospedeiras, (RASTAS *et al.* 2012) provavelmente também influenciam diretamente o desenvolvimento da doença.

A adoção de práticas que favoreçam o estabelecimento e a diversidade da microbiota do solo pode contribuir para a supressão de alguns patógenos de solo, e assim, na severidade ou incidência de algumas doenças (WHIPPS, 2001). Penalber (2009) sugere que o número de microrganismos presentes no solo e as mudanças na composição da comunidade microbiana são ferramentas importantes no controle da h ernia das crucíferas. Garbeva *et al.* (2006) concluiu que a densidade de *Pseudomonas* foi correlacionada com a redução da incidência de *R. solani* em batata. Existe, ainda, relato de redução da incidência da murcha de fus rio em solos

adubados com resíduos orgânicos de leguminosas. Esta redução é atribuída ao aumento da atividade microbiana em função do maior aporte de matéria orgânica. Neste caso, a matéria orgânica teria um efeito indireto na relação patógeno-hospedeiro, resultando em possível causa da supressão da doença (LAZAROVITS *et al.* 2001).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a relação entre características físico-químicas do solo, diversidade bacteriana e severidade da hérnia das crucíferas em áreas de cultivos de couve-flor no município de Nova Friburgo-RJ.

13. MATERIAL E MÉTODOS

13.1. Caracterização da área de estudo e coleta das amostras

O estudo foi realizado em propriedades familiares nas comunidades de Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande no município de Nova Friburgo, RJ, Brasil (-22° 17' 14''S e -42° 32' 01''W) com histórico de cultivo regular de couve-flor há mais de 30 anos e ocorrência generalizada de hérnia das crucíferas. Para escolha das propriedades, consideram-se dois critérios: pertencerem à associação de produtores de Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande e estarem com plantas de couve-flor em ponto de colheita. Inicialmente foram coletados um total de 168 amostras de solo e de plantas de couve-flor, cultivar Teresópolis ou Bola de neve, em 16 propriedades familiares distintas. As coletas foram feitas na safra de inverno, no mês de agosto de 2013.

A coleta foi iniciada por um corte rente a base da planta em ponto de colheita separando-se parte aérea e raiz. Para o estudo detalhado das raízes, coletaram-se amostras indeformadas de solo com auxílio de um cilindro de metal com 25 cm de diâmetro e 30 cm de profundidade. Neste momento, foi retirada uma amostra do solo de cada cova o qual foi guardado em tubos Falcon® de 50 mL, identificados e armazenados em Freezer a -20° para avaliação da diversidade bacteriana no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos da UFRRJ. Além disso, nesse mesmo, local foi retirada uma amostra de solo para posterior análise físico-química e contagem de esporos de resistência de *P. brassicae*.

13.2. Análise da parte aérea e raízes

Segmentou-se a parte aérea das plantas em folhas, caule e inflorescência e aferiu-se a massa de matéria fresca de cada órgão de cada planta. Os blocos contendo solo e raiz foram desfeitos e as raízes cuidadosamente separadas, lavadas para remoção do solo aderido e pesadas para determinação da massa fresca total. Posteriormente, as raízes foram submetidas a determinação do volume total de raiz e avaliadas pela escala de notas de Takahashi *et. al.* (2005) para estimar a severidade da hérnia. Em seguida, separaram-se as raízes com galhas, das raízes sadias e quantificaram-se as respectivas massas frescas e volumes. Também, determinou-se o volume de raízes sadias e com galhas através da aferição do volume de água deslocado em uma proveta graduada. Calculou-se a percentagem de raízes com hérnia (PRH) e de raízes sadias (PRS) pela relação entre os volumes de raiz com hérnia e sadia e o volume total das raízes, respectivamente. Os resultados desta análise de parte aérea, raiz e intensidade da Hérnia (volume total, sadia e doente; percentagem de raízes com hérnia (PRH) e de raízes sadias (PRS)) foram utilizados para selecionar as amostras para análise de diversidade bacteriana.

13.3. Avaliação da diversidade bacteriana

Para estimar a diversidade bacteriana foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), no intuito de visualizar fragmentos de DNA (bandas no gel) de acordo com diferenças em suas sequências de nucleotídeos, que são chamados Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) (MESQUITA, 2011). O número total de UTO's identificado em cada tratamento está relacionado com a diversidade de populações bacterianas.

Para extração do DNA total dos solos, utilizou-se o kit Power Soil® DNA Isolation (MO BIO Laboratories) segundo instruções do fabricante. Posteriormente, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 0,8% acrescido de SYBER safe DNA Gel Stain (Invitrogen)

para avaliar a concentração do DNA extraído, utilizando como marcador de concentração de DNA o fago lambda (Promega) a 25 e 50 ng.

Para aumentar o rendimento dos produtos amplificados, foram realizadas três reações de PCR. A primeira reação foi realizada com os *primers* 27F (SUZUKI e GIOVANNONI, 1996) e 1512R (KANE *et al.* 1993) que amplificam a região 16S do rDNA de bactérias gerando um fragmento de 1500 pb. As amplificações foram conduzidas segundo as seguintes condições: Hot start¹; desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto; anelamento a 58°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A segunda reação foi realizada utilizando-se como molde 2,0 µL do produto de PCR da 1ª reação. Foram utilizados os *primers* GC338F e 518R (OVREAS *et al.* 1997) que amplificam a região V3 do gene 16S rDNA de bactérias gerando fragmentos de aproximadamente 198 pb. As amplificações foram conduzidas nas mesmas condições do primeiro PCR, exceto para o anelamento que foi utilizado a 55°C por 1 minuto. Uma terceira reação foi realizada, utilizando-se as mesmas condições que na segunda para aumentar a quantidade de produtos de PCR que foram utilizados no DGGE.

Para avaliar os produtos de amplificação, aplicou-se 5,0 µL do produto de PCR no gel de agarose 1,5% realizando-se eletroforese a 100 V; 400 mA por 40 min.

Os produtos da terceira reação de PCR separados em géis de concentração 8% de poliacrilamida e gradiente de concentrações entre 45% - 60%, definido a partir da mistura de uréia e formamida deionizada. A eletroforese foi realizada a 70V e 60°C por 16h em um equipamento DcodeTM “Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad, Richmond, EUA).

Após a eletroforese foi realizada a coloração do gel com nitrato de prata para visualização das bandas. Primeiramente, utilizou-se a solução de fixação (etanol 10%; ácido acético 1%) por 20 minutos em um recipiente de vidro. O gel foi lavado com água e adicionou-se a solução de pré-tratamento (ácido nítrico 1,5%) por 3 minutos. Lavou-se novamente o gel e adicionou-se a solução por impregnação (nitrato de prata 0,2%). O tempo de impregnação foi de 20 minutos, o excesso de prata foi retirado na lavagem com água. Adicionou-se então, a solução de revelação (carbonato de cálcio 3%; formaldeído 37%). O tempo total para revelar as bandas foi de 5 a 7 minutos. Posteriormente, a solução de bloqueio com ácido acético glacial (5%) foi adicionada por 5 minutos, encerrando o processo de coloração. O gel foi transferido para uma placa de vidro contendo papel celofane, e seco à temperatura ambiente.

Os géis foram fotografados e as imagens dos géis foram analisadas com o software Bionumerics (AppliedMaths, Saint-Martens-Latem), determinando-se as diferenças através do coeficiente de Dicce.

Os perfis de PCR-DGGE das amostras de solos com ocorrência de hérnia das crucíferas foram gerados e comparados por análises de agrupamento e componente principal. Para a análise agrupamento utilizou-se o algoritmo UPGMA para separação em grupos de amostras (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean).

13.4. Análise Físico-Química e contagem de esporos dos Solos

Para aferição dos atributos químicos e físicos dos solos, processaram-se as amostras de terra (secas ao ar e passadas por peneira com malha de 2,0 mm de diâmetro) e efetuaram-se as análises químicas para determinação dos teores de matéria orgânica (MO), pH (H₂O), P, K, Ca, Mg e Al trocáveis, H+Al, soma de base, areia, silte e argila, seguindo metodologia da

¹ Hot start ou “início quente”: Aquecimento da tampa do termociclador na pré-reação em cadeia da polimerase a 94 °C. Esse método pode evitar a amplificação de bandas inespecíficas.

Embrapa (DONAGEMA *et al.* 2011) e de B seguindo metodologia de azometina-H (ABREU *et al.* 1994, modificado).

Para a contagem do número de esporos de resistência de *P. brassicae* utilizou-se o método de Murakami *et al.* (2000) modificado. Amostras de 1,0 g de solo foram suspensas em 50,0 mL de água destilada e autoclavada e agitadas por 5,0 min. Em seguida, ajustou-se o pH da suspensão para 10,0 utilizando-se NaOH a 1 mol/L, e submeteu-a novo ciclo de agitação por mais 5,0 min. Terminado o ciclo, reajustou-se o pH da suspensão para 9,0 com NaOH a 1,0 mol/L seguido de novo ciclo de agitação por mais 5,0 min. Peneirou-se a amostra em filtro formado por quatro camadas de tecido mousseline e, em seguida, centrifugou-se o filtrado a 2000 rpm por 10 minutos (centrífuga de bancada Nova Instruments, modelo NI1814). O resíduo foi lavado com água destilada, centrifugado mais três vezes e, finalmente, ressuspensionado em 50 mL de água destilada. Para facilitar a visualização dos esporos, adicionaram-se 90 µL de azul de algodão a alíquotas de 400 µL da suspensão. Contabilizou-se o número de esporos de resistência em três amostras de cada suspensão com auxílio de Câmara de Neubauer e visualização em microscópio óptico e objetiva de 100X.

13.5. Análise estatística

Os dados da análise de parte aérea (acúmulo de biomassa fresca) e raiz (escala de Takahashi *et al.* 2005 e volume de raiz total, sadias e doentes) das 168 amostras foram submetidas à análise de componentes principais, cujo objetivo foi verificar quais amostras tinham maior relação com os atributos da hérnia das crucíferas visando selecionar um grupo menor de amostras a serem estudadas quanto a diversidade bacteriana.

Após a obtenção de um número menor de amostras, os perfis de PCR-DGGE de extratos de DNA das amostras de solos com ocorrência de hérnia das crucíferas, foram analisados e comparados no software Bionumerics (AppliedMaths, Saint-Martens-Latem), e os grupos obtidos pelo método de agrupamento UPGMA (na análise da diversidade bacteriana).

Para aplicação da técnica de análise multivariada em dados de PCR-DGGE, as imagens dos géis, normalizadas e convertidas, são transformadas em matrizes de presença/ausência de bandas a serem tratadas como espécies (SALLES *et al.* 2004).

Após a obtenção dos grupos pelo método de agrupamento UPGMA (na análise da diversidade bacteriana), no software Bionumerics (AppliedMaths, Saint-Martens-Latem), foram selecionadas variáveis de solos que caracterizaram a formação dos grupos. Para tanto, utilizaram-se os dados da análise Físico-Química e contagem de esporos dos Solos. O software R (R Core Team, versão 3.2) foi usado para proceder às análises descritas abaixo.

Uma vez identificados os grupos, calcularam-se os respectivos parâmetros de posição (média) e de amplitude (desvio padrão, mínimo e máximo) das diferentes variáveis relacionadas aos atributos físico-químicos (teores de matéria orgânica (MO), pH (H₂O), P, K, Ca, Mg e Al trocáveis, H+Al, soma de base, areia, silte e argila) e microbiológicos dos solos (nº de bandas/UTO's) e de intensidade da hérnia (volume de raiz sadia, volume de raiz com hérnia, volume total de raiz, percentagem de raiz com hérnia e sadias; e número de esporos). Estes dados foram apresentados graficamente e em tabelas.

Em seguida, realizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA), no software R (R Core Team, versão 3.2), com o objetivo de se verificar a interação entre os atributos do solo (pH, P, N, MO, SB, B) e diversidade bacteriana, determinada com base no número de bandas observadas pela técnica de DGGE e a interação entre os atributos da hérnia (VOLt, PRS, PRH, número de esporos no solo e severidade em escala de nota) e diversidade bacteriana do solo.

14. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de componentes principais das 168 amostras de plantas permitiu selecionar 17 amostras das 168 amostras iniciais. O número pequeno de amostras selecionadas em relação ao número de amostras iniciais se deve ao custo da técnica e ao tempo necessário para a execução das análises.

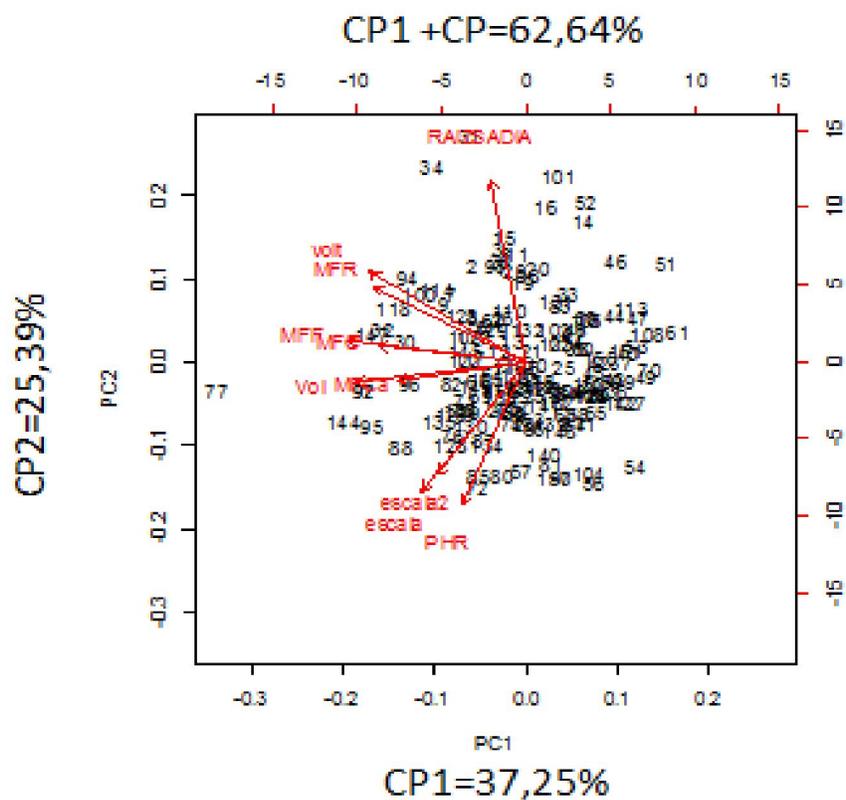


Figura 10: Análise de componente principal (biplot) das 168 amostras de plantas de couve-flor.

Pode se observar que o número de raízes sadias se correlacionou inversamente com a porcentagem de raízes com hérnia, e então as amostras que tiveram maior relação com as raízes sadias, assim como as amostras com maior relação com PHR, foram selecionadas, totalizando 17 amostras (Figura 10).

O grupo de 17 amostras foi estudado quanto à diversidade bacteriana e o perfil que reflete a diversidade bacteriana é apresentado na Figura 11. Nesta, consta uma das repetições do gel de DGGE utilizada para análise da diversidade bacteriana dos solos. O número de bandas de cada amostra de solo representa a soma de UTOs de quatro géis de DGGE. Com base na soma de UTOs, estimou-se a diversidade de espécies e construíram-se os dendogramas a partir da similaridade dos perfis eletroforéticos do DGGE.

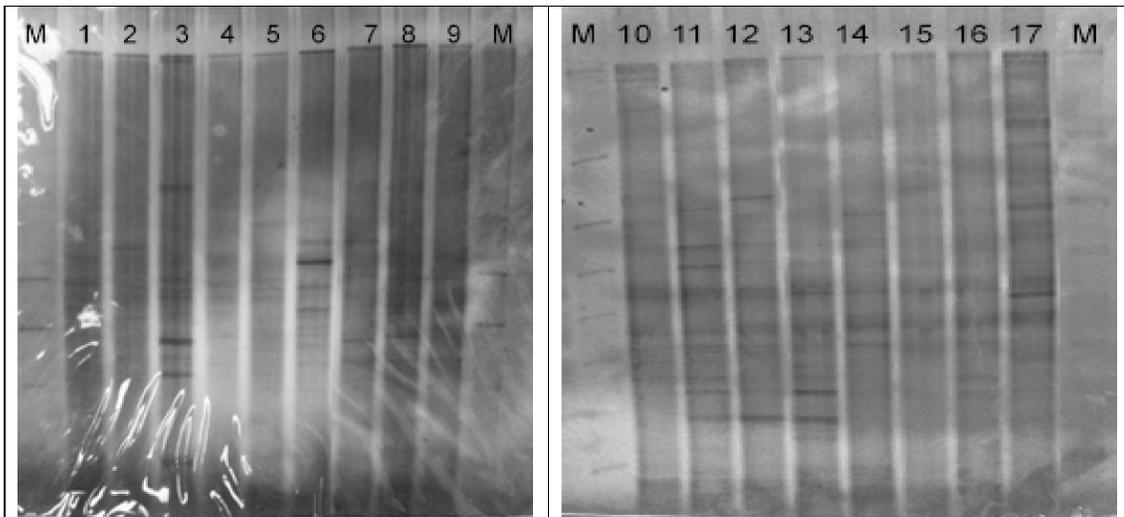


Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante dos produtos de amplificação da região 16 S do rDNA de Bacterias do DNA total extraído de 17 amostras de solo cultivado com couve-flor, em Nova Friburgo, RJ. M = Marcador II (código: 315-06404 Nippon Gene).

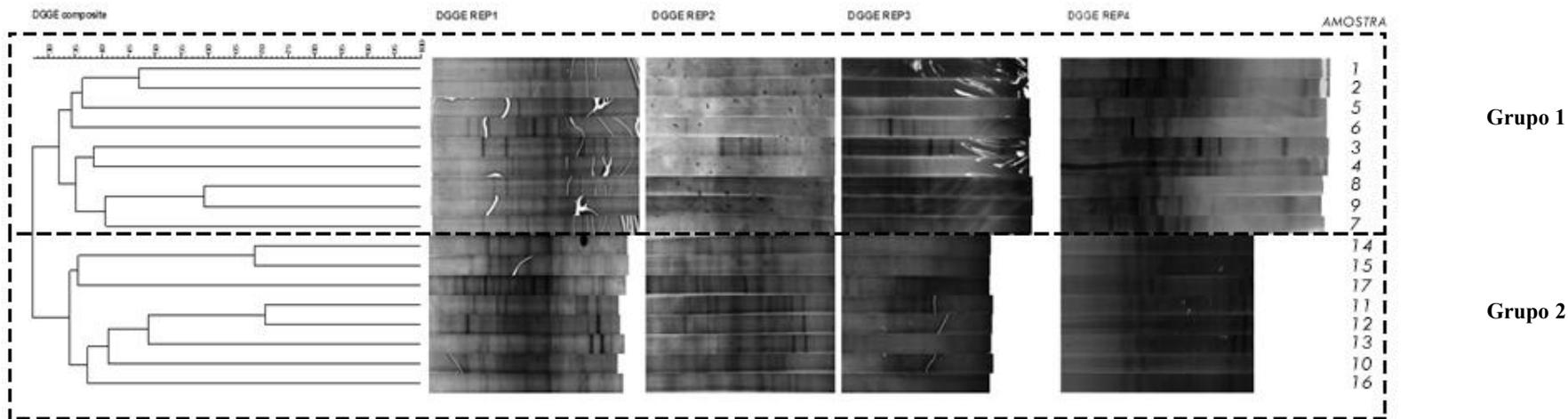


Figura 12: Dendrograma de similaridade genética de populações bacterianas de 17 amostras de solos cultivado com couve-flor em Nova Friburgo, RJ, obtido pelo método de agrupamento UPGMA a partir dos dados gerados na eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

Após a identificação dos grupos pelo método de agrupamento UPGMA, selecionaram-se variáveis de solo que melhor poderiam explicar a formação dos dois perfis bacteriano. A técnica de agrupamento permitiu reunir variáveis com características semelhantes entre si e com aumento de variabilidade entre os agrupamentos formados (YEMEFACK *et al.* 2005). Identificaram-se dois Grupos, sendo o Grupo 1 (G1) formado por 9 amostras e o Grupo 2 (G2) por 8 amostras (Figura 12). Estes dois grupos apresentaram características bem distintas quanto aos atributos físico-químicos e biológicos dos solos e às variáveis relacionadas à quantificação da hérnia das crucíferas (Figura 4).

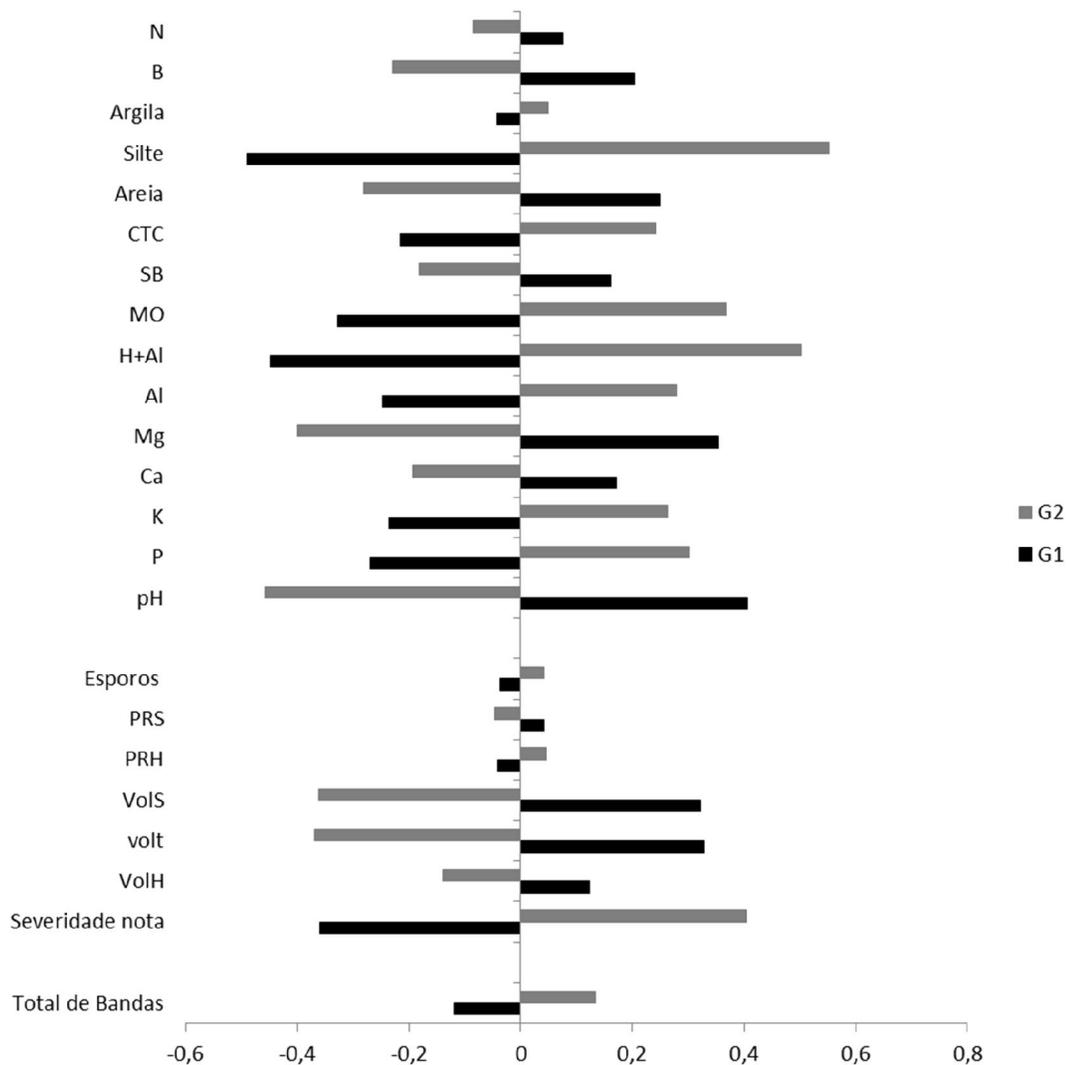


Figura 13: Médias padronizadas dos atributos físico-químicos e microbiológicos dos solos e intensidade da hérnia das crucíferas, nos dois grupos (G1 e G2) formados pela análise de agrupamento.

Severidade nota, estimada pela escala de Takahashi (2005); VolH, VolS e Volt - volume de raízes com hérnias, sadias e total; PRS e PRH - porcentagem de raízes sadias e com galhas; Esporos- número de esporos de resistência de *Plasmodiophora brassicae* por g de solo;

pH- pH em água; P- fosforo assimilável; K, Ca, Mg - potássio, cálcio e magnésio trocável; Al- alumínio trocável; H+Al- acidez potencial; MO- matéria orgânica do solo; SB- soma de base; CTC- capacidade de troca catiônica a pH=7; B - boro extraível e N- nitrogênio total.

O Grupo 1 (G1), caracterizado pelo menor número de bandas (UTOs) de bactérias apresentou maiores valores de pH, Ca, Mg, SB, B, N, areia; maior volume de raízes com hérnia (VolH), sadias (VolS) e total (Volt); maior porcentagem de raízes sadias (PRS); e menores teores de P e K, Al, H+Al, matéria orgânica (MO), CTC, silte e argila; menor severidade, medida pela escala de notas, bem como pela porcentagem de raízes com hérnia (PHR) e menor número de esporos de resistência do patógeno no solo (Figura 13, Tabela 7 e 8). O grupo 2 (G2), caracterizado pelo maior número de bandas (UTOs) de bactérias, destacou-se pelos maiores valores de P, K, Al, H+Al, MO, CTC, silte e argila; maior severidade da doença estimada com base na escala de notas e na porcentagem de volume de raízes com galhas (PHR) e número de esporos do patógenos. No G2, também se enquadram as amostras com menores valores de pH, Ca, Mg, SB, areia, maior volume de raízes com hérnia (VolH), sadias (VolS) e total (Volt); maior porcentagem de raízes sadias (PRS). Estes resultados da análise de agrupamento são confirmados pela análise de componentes principais (PCA) entre os atributos do solo e a diversidade bacteriana e entre a diversidade bacteriana e intensidade da doença (Figura 4). As componentes 1 e 2 (CP1 + CP2) entre os atributos do solo e a diversidade bacteriana explicam 51,82% da variância observada (Figura 14A) e mostram uma relação direta e positiva entre o número total de bandas e os teores de matéria orgânica, P, B e N no solo, e inversa com a saturação de bases e pH (Fig. 14A). E, as componentes 1 e 2 (CP1 + CP2) da PCA entre a diversidade bacteriana e variáveis relacionadas à intensidade da hérnia explicam 72,74% da variância observada (Figura 14B). A pouca relação entre o número de esporos de *P. brassicae* e o número de bandas enfatiza que a diversidade e a população de *P. brassicae* não estão diretamente correlacionadas, mas sim, que ambos estejam sendo influenciados pelas características distintas dos solos. E como já se esperava o número de esporos de *P. brassicae* apresentou uma relação estreita com a porcentagem de raízes com hérnia (PRH) e inversa com o volume total de raízes e porcentagem de raiz sadia (PRS) (Figura 14B).

Apesar das variações em muitas das características químicas e físicas dos solos, nos dois grupos, os solos exibiram perfis de DGGE muito próximos (Tabela 7), possivelmente devido ao manejo semelhante adotado nas diferentes propriedades e às aplicações consecutivas do mesmo fertilizante orgânico e mineral.

Os solos do G2, com maiores valores de matéria orgânica, apresentaram menores valores de pH e também maior severidade da doença e porcentagem de raízes com galhas (PRH) e maior número de bandas. Ou seja, a princípio, não existe relação entre a diversidade bacteriana e a severidade da hérnia. Acredita-se que a maior diversidade nos solos de G2 esteja relacionada ao maior teor de matéria orgânica que por sua vez propicia uma maior acidez do solo e, conseqüentemente, a uma condição mais favorável a *P. brassicae* e ao desenvolvimento da hérnia das crucíferas. Esta maior acidez nas amostras com maior matéria orgânica decorre da aplicação de cama de aviário fresca. O processo de decomposição deste adubo provoca acidificação do solo e, conseqüentemente, torna o um ambiente mais propício à hérnia das crucíferas. Este resultado contraria alguns relatos segundo os quais solos com maior teor de matéria orgânica são mais supressivos a doenças por fomentar a atividade microbiana, melhorar a estrutura do solo com maior aeração e retenção de umidade. No entanto, os relatos associando a matéria orgânica e hérnia das crucíferas, são contraditórios, alguns apontado efeito de redução, de promoção ou nenhum efeito sobre doença (ABBASSI *et al.* 2006; GHINI *et al.* 2007; LAZAROVITS *et al.* 2001; 2006). Altos níveis de matéria orgânica no solo têm sido associados à supressividade e redução de perdas pela hérnia, porém, com relatos divergentes

(DIXON 2014, GOSSEN *et al.* 2013). Entretanto, vários trabalhos têm demonstrado que o fator de solo mais determinante para a severidade da hérnia das crucíferas é a acidez do solo (BHERING *et al.* 2017; GOSSEN *et al.* 2014; DONALD e PORTER 2009).

Esta divergência pode estar associada aos tipos e formas de aplicação da matéria orgânica. No presente estudo, em 100% dos casos, a cama de ave é aplicada quando ainda fresca e diretamente na cova em cobertura, aos 30 dias após o transplante. Esta, ao ser mineralizada, resulta em elevação de temperatura e liberação de ácidos orgânicos e inorgânicos com consequente liberação de íons H⁺ e acidificação do solo e elevação dos teores de H+Al e de Al trocável (ECHART e CAVALLI-MOLINA 1999). A forma trocável deste elemento, Al³⁺, pode causar a redução no desenvolvimento radicular em função da toxidez e pode afetar a absorção de nutrientes e água, tornando as plantas mais vulneráveis aos danos causados pela doença ou agravando os sintomas caudados pelo *P. brassicae* (BHERING *et al.* 2017).

Ainda, dentre os principais efeitos que a matéria orgânica promove ao solo destacam-se: a elevação da capacidade de troca catiônica (CTC) (SOUSA *et al.* 2007). Isso foi observado no G2, o grupo que continha maior teor de MO. Este grupo apresentou maior CTC e, possivelmente, uma maior agregação das partículas por ter maior quantidade de argila.

O processo de mineralização da cama de ave fresca, provavelmente, favoreceu a atividade microbiana e a maior diversidade de bactérias, representado pelo maior número de UTOs em G2. Sabe-se que a disponibilidade de matéria orgânica e a qualidade dos resíduos adicionados ao solo podem afetar a atividade microbiana. SEVERINO *et al.* (2004) relatam influencia da MO sobre a concentração e atividade de microrganismos e, Da Silva *et al.* (2016) relatam que a atividade microbiana foi estimulada pela decomposição da cama aviária aplicada em cobertura em eucalipto.

Tabela 7. Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de atributos químicos e microbiológicos do solo nos dois grupos, G1 e G2, das áreas amostradas para estudo da hérnia das crucíferas em couve-flor

	pH	Ca	Mg	K	P	MO	C	Al	H+Al	Nº de bandas
Grupo 1	H ₂ O	cmolc/kg		...mg/kg...		..g/kg...		cmolc/kg		Unidade
Média	5,49	4,56	1,02	226,22	171,11	28,98	1,68	0,32	5,53	37,33
DP	0,46	2,47	0,31	96,87	87	5,76	0,34	0,62	2,80	6,89
Mínimo	4,6	1,7	0,5	93	85	21,72	1,26	0	1,4	30
Máximo	5,9	10,1	1,3	372	324	36,89	2,14	1,6	9,2	51
	pH	Ca	Mg	K	P	MO	C	Al	H+Al	Nº de bandas
Grupo 2	H ₂ O	cmolc/kg		...mg/kg...		..g/kg...		cmolc/kg		Unidade
Média	5,04	3,77	0,75	298,37	258,62	33,04	1,92	0,66	7,97	39,63
DP	0,5	1,75	0,37	184,38	200,61	5,42	0,31	0,66	1,58	11,40
Mínimo	4,4	1,2	0,2	124	75	24,41	1,59	0	5	30
Máximo	5,6	6,5	1,4	714	672	40,51	2,35	1,8	9,8	63

Tabela 8. Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de atributos físico nos dois grupos, G1 e G2, das áreas amostradas para estudo da hérnia das crucíferas em couve-flor

Grupo 1	Areia	silte	Argila
g/kg.....		
Média	511,67	140,67	347,67
DP	117,13	27,44	121,09
Mínimo	432	97	143
Máximo	718	185	457
Grupo 2	Areia	silte	Argila
g/kg.....		
Média	461,25	182,5	359,25
DP	58,74	41,96	53,23
Mínimo	407	135	293
Máximo	546	265	436

Tabela 9. Médias, desvio padrão (DP) e valores mínimos e máximos de atributos relacionados à quantificação da intensidade da hérnia das crucíferas em plantas de couve-flor nos dois grupos, G1 e G2, identificados na análise de agrupamento

Grupo 1	Volume de raiz ml			Porcentagem de raiz		Número de esporos/ g de solo(log*)
	Galha	Total	Sadia	Galhas	Sadias	
Média	33	71	37,89	53,30	46,70	6,97
DP	15,19	31,86	29,14	22,73	22,73	6,89
Mínimo	15	18	3	13,91	16,67	6,48
Máximo	62	115	99	83,33	86,09	7,46
Grupo 2	Volume de raiz ml			Porcentagem de raiz		Número de esporos/ g de solo (log*)
	Galha	Total	Sadia	Galhas	Sadias	
Média	28,75	50,50	21,75	55,23	44,77	6,99
DP	19,04	23,71	12,08	23,12	23,12	6,52
Mínimo	8	15	4	26,67	10,87	6,74
Máximo	57	83	38	89,13	73,33	7,18

*log na base 10

Os solos de G2, que contém maior diversidade bacteriana, também apresentaram menores teores de B, Ca e Mg que podem também ter contribuído para a maior severidade da hérnia. Estes nutrientes, especialmente o Ca e B, são relatados como associados a condições de supressividade à hérnia das crucíferas (DIXON, 2009a; NOTT *et al.* 1999; RUARO *et al.* 2009)). Além disso, as argilas e a própria matéria orgânica podem combinar com o boro do solo, resultando em sua menor disponibilidade (RUARO *et al.* 2009). Isso corrobora com os resultados apresentado em G2, detentor de maior argila e MO, e menor B.

Apesar de os níveis de P e K trocáveis encontrados nos solos de G1 serem menores que os de G2 (P= 171,11 mg.kg⁻¹ G1; P= 226,22 11 mg.kg⁻¹ G2; K= 226,2211 mg.kg⁻¹ G1 e

K=298,37 11 mg.kg⁻¹ G2) estes valores são considerados elevados e não são limitates à produção de couve-flor (FREIRE *et al.* 2013), e, provavelmente também não limitantes à atividade bacteriana do solo. Merece destaque, porém, o maior teor de fósforo no Grupo 2 pode estar relacionado com a MO, pois Brito *et al.* (2005) constatou que o esterco de poedeiras aumenta os teores de P no solo. Estes maiores teores de P poderiam também estar envolvidos com o maior número de bandas nos solos que compõem G2. De acordo com Madigan *et al.* (2016) entre os muitos elementos presente nos organismos vivos, o fósforo é provavelmente o mais importante em termos ecológicos. Ainda, o maior teor de fósforo pode ser relacionado com o maior número de bactérias no solo, pois as bactérias, assim como os fungos e actinomicetos estão envolvidos nos processos metabólicos para solubilização e mineralização do P (PAUL e CLARK, 1997; RICHARDSON 2001). Porém, esses processos incluem a excreção de íons de hidrogênio e liberação de ácidos orgânicos (MENDES e JÚNIOR 2003), que podem reduzir o pH na região rizosférica e sugere favorecer a ocorrência do *P. brassicae*. Portanto, deve se ter o manejo racional da matéria orgânica e de fertilizantes fosfatados e solos com ocorrência de hérnia.

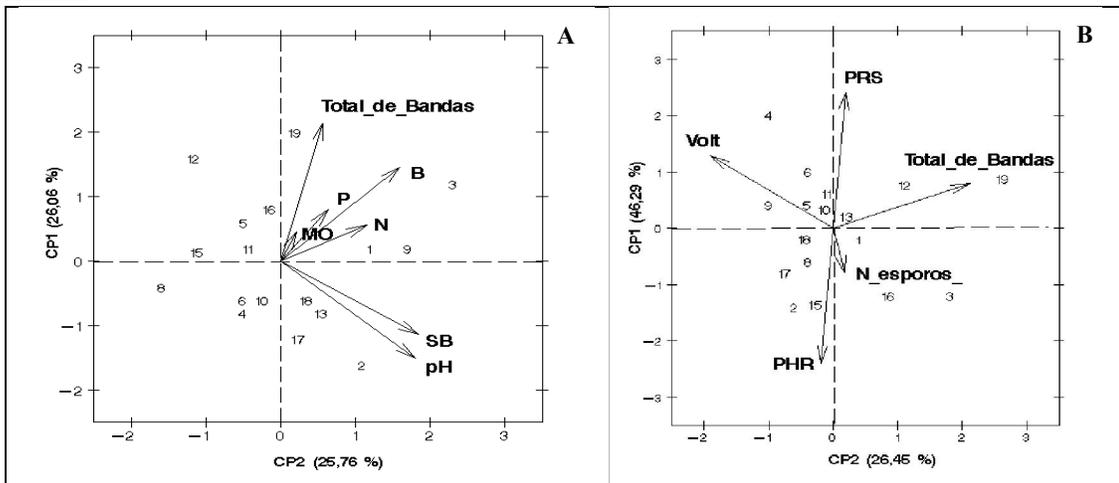


Figura 14. Análise de componentes principais (Gráfico biplot) relativos ao estudo da relação entre atributos dos solos, diversidade bacteriana e variáveis relacionadas à intensidade da hérnia das crucíferas em couve flor: **A:** atributos do solo x diversidade bacteriana; **B:** severidade bacteriana e intensidade da hérnia das crucíferas - **pH** em água; **SB-** soma de bases; **P-** fosforo; **PRH e PRS-** porcentagem de raízes com hérnia e sadias; **Volt-** volume de raiz total. **Nº de esporos-** concentração de esporos de *P. brassicae* no solo; **Total de bandas-** número de bandas das três repetições do gel.

15. CONCLUSÕES

1. A intensidade da hérnia das crucíferas e a diversidade bacteriana não foram correlacionadas;
2. A matéria orgânica e a disponibilidade de fósforo e potássio foram os fatores de solo que mais influenciaram positivamente a diversidade bacteriana.

16. REFERÊNCIAS

- ABBASSI, P.A; CONN, K.L and LAZAROVITIS, G. Effect of Fish emulsion used as a pre-plant soil amendment on verticillium wilt, common scab, and tuber yield of potato. **Canadian Journal of Plant Pathology** 28:509-518. 2006
- ABREU, C. A. de, ABREU, M. F., VAN RAIJ, B.; BATAGLIA, O. C., and Andrade, J. C. de. Extraction of boron from soil by microwave heating for ICP OES determination. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 25, n. 19-20: 3321-3333. 1994.
- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Brasil, 2016. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em 26 de janeiro de 2016.
- BHERING A.S.; DO CARMO, M.G.F.; MATOS, T. S.; LIMA, E. S. A.; SOBRINHO, N. M. B. A. Soil Factors Related to the Severity of Clubroot in Rio de Janeiro, Brazil. **Plant disease**. 2017.
- BRITO, O. R.; VENDRAME, P. R. S.; BRITO, R. M. Alterações das propriedades químicas de um Latossolo Vermelho distroférrico submetido a tratamentos com resíduos orgânicos. Semina: **Ciências Agrárias**, v.26, p.33-40. 2005.
- DA SILVA, A. J., DE OLIVEIRA, V. H., DOS SANTOS, J. G., DA SILVA, M. D. T., DOS SANTOS, T. E. B., e DA CUNHA, F. F. Atributos biológico e físico-hídricos de um solo cultivado com eucalipto adubado com cama de frango em Mineiros-Go. **Global science and Technology**, 2016.
- DIXON, G. E. Clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) – an agricultural and biological challenge worldwide. **Canadian Journal of Plant Pathology** 36(sup 1): 5-18. 2014.
- DIXON GR. *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 28, n. 3, p. 212-228. 2009.
- DONAGEMA, G. K, CAMPOS, D. V. B DE., CALDERANO, S. B., TEIXEIRA, W. G., and Viana J.H.M. **Manual e métodos de análise de solo**. Embrapa solos. 230 p. 2011
- DONALD, C. & PORTER, I. Integrated control of clubroot. **Journal Plant of Growth Regulation**, 28:289–303. 2009.
- ECHART, C. L e CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.531-541. 2001.
- GARBEVA, P.; POSTMA, J.; van VEEN, J.A.; van ELSAS, J.D. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 233–246, 2006.
- GHINI, R. PATRICIO, F.R.A.; BETTIOL, W.; ALMEIDA, I.M.G. and MAIA, A.H.N. Effect of sewage sludge on suppressiveness soil-born plant pathogens. **Soil Biology & Biochemistry**. 39:797-805. 2007

GOSSEN BD, KASINATHAN H, CAO T, MANOLII VP, STRELKOV SE, HWANG SF, MCDONALD MR. Influence of pH and temperature on infection and symptom development of clubroot in canola. **Canadian Journal of Plant Pathology**. 35:294–303. 2013.

GOSSEN, B.D., ADHIKARI, K.K.C., and MC DONALD, M.R. Effect of seeding date on development of clubroot in vegetable Brassica crops. **Canadian Journal of Plant Pathology**. 34, 516–523. 2012.

KANE, D. J.; SARAFIAN, T. A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S.; BREDESEN, D. E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, 262(5137):1274-1277, 1993.

KASINATHAN, H. **Influence of pH, temperature, and biofungicides on clubroot of canola** (Doctoral dissertation). 2012.

KONG KAW WA, S. **Discovering clubroot resistance genes in Brassica vegetable crops**. Ph.D. Tese, RMIT University, Melbourne, Australia. 2009.

LAZAROVITS, G. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. **Canadian Journal Plant Pathology**, Guelph, v.23, p.1-7, 2001.

MACFARLANE, I. Factors affecting the survival of *Plasmodiophora brassicae* Wor. In the soil and its assessment by a host test. **Annals of Applied Biology**, 39(2): 239-256, 1952.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H., e STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora. 2016.

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

MESQUITA, V. A. **Caracterização da diversidade de solo do Cerrado de Minas Gerais por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2011.

MURAKAMI, H.; TSUSHIMA, S.; AKIMOTO, T.; MURAKAMI, K.; GOTO, I.; SISHIDO, Y. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology**, v. 49, n. 5, p. 584-589. 2000.

NARISAWA, K.; SHIMURA, M.; USUKI, F.; FUKUHARA, S.; HASHIBA, T. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of hénria das crucíferas in Chinese cabbage by *Heteroconium chaetospira*. **Plant Disease**, v. 89, p. 285–290, 2005.

NIWA, R.; NOMURA, Y.; OSAKI, M; EZAWA, T. Suppression of clubroot disease under neutral pH caused by inhibition of spore germination of *Plasmodiophora brassicae* in the rhizosphere. **Plant Pathology**, v. 57, 445–452, 2008.

NOTT, H., FALLOON, R., e CHEAH, L. H. Clubroot control from safe chemicals. **Commercial Grower**, 54:24-26. 1999.

OVREÅS, L., FORNEY, L., DAAE, F. L., and TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, 63(9), 3367-3373. 1997.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. San diego: Academic Press, 340 p.1996.

PENALBER, A.T.T; 2009. **Controle alternativo da hérnia das crucíferas causada por *Plasmodiophora brassicae* em brócolis através de composto orgânico**. Tese: Departamento de fitopatologia, Instituto de ciências biológicas Universidade Federal de Brasília. 2009.

PENG, G.; MCGREGOR, L.; LAHLALI, R; GOSSEN, B.D.; HWANG, S.F.; ADHIKARI, K.K.; STRELKOV, S.E.; McDONALD, M.R. Potential biological control of clubroot on canola and crucifer vegetable crops. **Plant Pathology**, v. 60, 566–574, 2011.

RASTAS, MARIKA, SATU LATVALA, AND ASKO HANNUKKALA. "Occurrence of *Plasmodiophora brassicae* in Finnish turnip rape and oilseed rape fields." **Agricultural and Food Science** 21.2: 141-158. 2012.

REIS, A. **Hérnia das crucíferas**. Comunicado Técnico, nº 72, Embrapa Hortaliças, Brasília, 2009.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soli microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, V.28, p.897-906. 2001.

RUARO, L., LIMA NETO, V. C., e RIBEIRO JÚNIOR, P. J. Influência do boro, de fontes de nitrogênio e do pH do solo no controle de hérnia das crucíferas causada por *Plasmodiophora brassicae*. **Tropical Plant Pathology** 34(4): 231-238. 2009.

SALLES, J.F.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Multivariate analyses of Burkholderia species in soil; Effect of crop and land use history. **Applied na Environmental Microbiology**, v.70:4012-4020.2004.

SEVERINO,L. S. et al., Mineralização da torta de mamona, esterco bovino e bagaçode cana estimada pela respiração microbiana. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, V. 5; N. 1. 2004.

SHARMA, K., GOSSEN, B. D., AND MCDONALD, M. R. Effect of temperature on cortical infection by *Plasmodiophora brassicae* and clubroot severity. **Phytopathology** 101:1424-1432. 2011.

SOUSA, D.M.G. de; e OLIVEIRA, S. A. **Acidez do solo e sua correção**. p. 205- 274 em: Fertilidade do Solo. SBCS, Viçosa. 2007.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 2, p. 625-630, 1996.

TAKAHASHI, H.; CEBRIAN, I.T.; SOUZA, N.L. Inoculação de *Plasmodiophora brassicae* agente causal da "hérnia das crucíferas". **Summa Phytopathologica**, v. 31, supl., p. 16. 2005.

WALLENHAMMAR A.C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. **Plant Pathology**. 45: 710 – 9. 1996.

WHEELER, T. and RUSH, C.M. Soilborne diseases. In: Maloy, O.C. & Murray, T.D. (Eds.) **Encyclopedia of Plant Pathology**. New York. JohnWiley and Sons. pp.935-947. 2001.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**. 52:487-511.2001.

YEMEFACK, M.; ROSSITER, D. G.; NJOMGANG, R. Multi-scale characterization of soil variability within an agricultural landscape mosaic system in southern Cameroon. **Geoderma**, v.125, p.117-143, 2005.

CAPÍTULO IV

DOSES DE CALCÁRIO PARA CORREÇÃO DA ACIDEZ DO SOLO E SEUS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE COUVE-FLOR E NO CONTROLE DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS

RESUMO

Apesar da reconhecida importância da correção da acidez do solo para a nutrição da couve-flor e manejo da hérnia das crucíferas, muitos produtores não a realizam, ou o fazem sem critério técnico. Assim, presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes doses de calcário na correção da acidez do solo e melhoria de sua fertilidade e a resposta de duas cultivares de couve-flor quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, redução da severidade da hérnia das crucíferas e produtividade em Nova Friburgo, RJ. Realizou-se um experimento em propriedade familiar, localizada no município de Nova Friburgo. Adotou-se o delineamento de blocos ao acaso em esquema fatorial 2x4, duas cultivares de couve-flor ('Piracicaba Precoce' e 'Sharon') e quatro doses de calcário Mineral (0,0, 1,0, 2,0 e 4,0 t/ha) e quatro repetições. Avaliaram-se a fertilidade do solo, logo antes do transplantio e ao final do ciclo, o desenvolvimento radicular, a severidade da hérnia das crucíferas, o desenvolvimento das plantas, a produtividade e qualidade das inflorescências e a concentração e acúmulo de nutrientes e alumínio. E observou que a calagem favoreceu o desenvolvimento e ganhos de biomassa, de produtividade e qualidade de couve-flor, mesmo sem ter reduzido significativamente a severidade da hérnia das crucíferas; a calagem não reduziu a formação de galhas, mas favoreceu a emissão de raízes pelas plantas de couve-flor; as plantas da cultivar Sharon responderam melhor à calagem que as plantas de Piracicaba Precoce.

Palavras-Chave: *Brassica oleracea var. botrytis*; *Plasmodiophora brassicae*; acidez do solo.

17. INTRODUÇÃO

A couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) destaca-se pela sua importância econômica, principalmente nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. Na região Sudeste, um dos principais municípios produtores é o de Nova Friburgo, RJ, localizado na Região Serrana. Este município apresenta grande produção de hortaliças e é um dos responsáveis pelo abastecimento do mercado local e da capital do Estado, a cidade do Rio de Janeiro.

Devido às condições climáticas favoráveis à cultura e à proximidade com a capital, cultiva-se couve-flor na região praticamente o ano todo há vários anos. Esse histórico, associado às características do relevo e às práticas de cultivos adotadas na região, favorece a ocorrência e disseminação da hérnia das crucíferas, causada por *Plasmodiophora brassicae*. Essa é a doença mais limitante ao cultivo de *Brassica* spp. em todo o mundo, inclusive na região do presente estudo. Esse patógeno é um protozoário biotrófico, habitual do solo e específico de plantas da família *Brassicaceae*. As perdas pela doença na região são agravadas pelo cultivo intensivo e regular de couve-flor, repolho e/ou brócolis, pela possibilidade de mais de uma safra por ano, e pela ocorrência de condições de ambiente favorável, especialmente nas safras de meia estação e de verão - temperaturas amenas, de 20 a 26°C, e alta pluviosidade (ROSA *et al.* 2010; GOSSSEN *et al.* 2013; INMET 2017).

O patógeno apresenta duas fases em seu ciclo de vida: a) no solo, onde sobrevive como esporos de resistência por mais de 3 a 6 anos em campos fortemente infestados (WALLENHAMMAR 1996), e há relatos de sobrevivência por até vinte anos sem a presença de hospedeiro (DIXON 2009); b) infectando plantas da família *Brassicaceae*. Ao infectar e colonizar as raízes das plantas induz a formação de galhas ou hérnias que levam à redução do sistema radicular efetivo, conseqüentemente, da absorção de água e nutriente, o que desencadeia um conjunto de sintomas secundários como murcha nos horários mais quentes do dia, subdesenvolvimento e, em casos mais severos, morte da planta (KONG KAW WA, 2009; PENALBER, 2009; MARINGONI, 1997). Ao final do ciclo da cultura, as raízes apodrecem e o patógeno entra na fase de sobrevivência na forma de esporos de resistência no solo.

A dispersão dos esporos e disseminação da doença ocorrem por meio de transporte ou arraste de solos, uso de água para irrigação contaminada e utilização de mudas infectadas (COSTA e VENTURA, 2004). O desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas de 10 a 30°C (ROSA *et al.* 2010), sendo a ótima 25°C (SHARMA *et al.* 2011), umidade do solo elevada, superior a 70% da capacidade de campo (HORIUCH e HORI, 1980; AYERS 1944; GLUDOVACZ 2013), e solos ácidos e com baixos níveis de Ca (WEBSTER e DIXON, 1991; DONALD e PORTER *et al.* 2002 e 2004)

A inexistência, até o momento, de um produto químico eficiente para controle da doença e de cultivares resistente dificultam o controle da doença. Recentemente foi registrado no MAPA o primeiro princípio ativo para controle da doença, o ciazofamida (AGROFIT, 2016). Além disso, a não adoção de medidas básicas de caráter preventivo, o manejo inadequado dos solos, a não observação de práticas como pousios e rotação de culturas e calagem contribuem para o agravamento da doença na região de Nova Friburgo (BHERING *et al.* 2017) e em várias outras regiões (ARAÚJO *et al.* 2009; RUARO *et al.* 2009, 2010).

A elevação do pH do solo é medida básica para manejo da doença. Segundo Schuta (2003) e Hasse (2005), a doença é mais severa em solos com pH inferior a 5,7; menos severa em solos com pH variando de 5,7 a 6,2; praticamente inibida em solos com pH maior que 7,8. Ainda, a couve-flor caracteriza-se por ser uma cultura exigente em fertilidade e por produzir melhor em solos com pH variando entre 6,0 a 6,8, saturação por bases (V) igual a 80% e teor de Mg + Ca de no mínimo 3,0 cmol_c/dm³ (GUERRA *et al.* 2013). A cultura também é citada como exigente em micronutrientes como molibdênio, boro, cobre, ferro, manganês e zinco e a

disponibilidade adequada desses elementos é citada como importante para se garantir plantas saudáveis e produtivas (MAY *et al.* 2007).

Apesar da reconhecida importância da correção da acidez do solo para a nutrição da couve-flor e manejo da hérnia das crucíferas, muitos produtores não a realizam, ou o fazem sem critério técnico. No caso particular dos agricultores pertencentes às comunidades de Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande em Nova Friburgo-RJ, apenas 12% dos agricultores a realizam visando o cultivo de couve-flor (vide capítulo 1). Em levantamentos feitos nas propriedades locais, constatou-se cultivo de couve-flor em solos com pH variando de 4,5 a 6,1, em sua maioria aquém do recomendado para a cultura (MAY *et al.* 2007) e do recomendado para manejo da hérnia das crucíferas (RASHID *et al.* 2013; NARISAWA *et al.* 2005; RASTAS *et al.* 2012). Ainda, apesar da importância da cultura na região e da calagem para a mesma, inexistem trabalhos voltados para ajustes de doses e avaliação de respostas da cultura.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes doses de calcário na correção da acidez do solo e na melhoria de sua fertilidade e a resposta de duas cultivares de couve-flor quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, redução da severidade da hérnia das crucíferas e produtividade em Nova Friburgo, RJ.

18. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma propriedade familiar localizada no município de Nova Friburgo, próximo ao Parque Estadual dos Três Picos RJ, na Serra do Mar, Estado do Rio de Janeiro (coordenadas -22° 19' 45'' - 22° 23' 45'' S e -42° 35' 05'' - 42° 40' 10'' W), no período de setembro de 2014 a março de 2015.

A área escolhida foi previamente cultivada com aveia preta (*Avena strigosa*), semeada em junho de 2014 e dessecada com aplicação de glifosato (1L/200L de água) cerca de dois meses antes da aplicação dos tratamentos. As doses de calcário para a realização da curva de calibração e a adubação de plantio e cobertura foram realizadas conforme a análise química do solo (Tabela 10).

Tabela 10. Resultado da análise química do solo antes da aplicação dos tratamentos.

	pH	Al	Ca	Mg	Corg.	V	m	P	K
	ÁguaCmol/dm ³%.....		mg/L.....	
0-20 cm	5,29	0,30	5,45	1,20	2,15	42,50	1,00	144,50	1354,00
20-40 cm	5,00	0,50	2,95	0,95	2,03	21,50	10,36	97,50	1633,00

Corg- carbono orgânico; m- saturação por alumínio.

A palhada da aveia, após dessecação, foi triturada com a passagem de um triturador/compactador (Triton) e deixada na superfície do solo. Em setembro de 2014, cerca de 90 dias antes do transplante da couve-flor, efetuou-se a aplicação das diferentes doses de corretivo (0; 1,0; 2,0 e 4,0 t/ha). Utilizou-se o corretivo Mineral, calcário parcialmente calcinado (PRNT igual a 104,5 %), seguido de incorporação com auxílio de enxada rotativa.

A definição das doses de corretivo para neutralizar o alumínio do solo foi feita a partir de curva de neutralização, a partir da incubação de 200 g de TFSA oriunda da área experimental, que foram acondicionadas em potes plásticos e mantidos a 70% da capacidade de campo. Às respectivas amostras, adicionaram-se doses crescentes do corretivo utilizado. Mediu-se o pH uma semana após o início do período de incubação e, aos 9, 11, 15 e 30 dias após, até a sua estabilização. Calculou-se a quantidade de calcário necessária para alcançar-se o pH 6,5, considerado ideal para a cultura (MAY et al., 2007), sendo este alcançado com a dose de 4,0 t.ha⁻¹. As demais doses foram obtidas pela divisão sequencial da dose máxima.

Aproximadamente 12 dias antes do transplante, efetuou-se uma aração e uma gradagem em nível, seguido de aplicação de herbicida oxifluorfem e paraquat (3L/ha) para controle de plantas espontâneas. Também foi realizado o coveamento manual, observando-se o espaçamento de 0,5 x 0,5 m.

Antes do transplante, coletaram-se amostras compostas de solo de cada uma das parcelas para posteriores análises de fertilidade e contagem do número de esporos de resistência de *P. brassicae*. Para a avaliação dos atributos do solo, as amostras de solo foram processadas, e as análises químicas foram realizadas para determinar os teores de matéria orgânica (MO) (e passados através de uma peneira com uma malha de 2,0 milímetros de diâmetro secos ao ar); pH (H₂O); P assimilável e de K, Ca, Mg e Al (Al⁺³); o potencial de acidez (H+Al); a capacidade de troca catiônica (CTC) em pH 7,0, de acordo com a metodologia da EMBRAPA (DONAGEMA et al. 2011). As amostras de solo destinadas à contagem de esporos de resistência foram congeladas até o momento da avaliação.

Para a contagem do número de esporos de resistência do patógeno, tomaram-se alíquotas de 1,0 g de solo que foram suspensas em 50,0 mL de água destilada e autoclavada e agitadas por 5,0 min. Em seguida, ajustou-se o pH da suspensão para 10,0 utilizando-

se NaOH a 1 mol/L, e submeteu-a novo ciclo de agitação por mais 5,0 min. Terminado o ciclo, reajustou-se o pH da suspensão para 9,0 com NaOH a 1,0 mol/L seguido de novo ciclo de agitação por mais 5,0 min. Peneirou-se a amostra em filtro formado por quatro camadas de tecido mousseline e, em seguida, centrifugou-se o filtrado a 2000 rpm por 10 min (centrífuga de bancada Nova Instruments, modelo NI1814). O resíduo foi lavado com água destilada, centrifugado mais três vezes e, finalmente, ressuspenso em 50 mL de água destilada. Para facilitar a visualização dos esporos, adicionaram-se 90 µL de azul de algodão a alíquotas de 400 µL da suspensão. Contabilizou-se o número de esporos de resistência em três amostras de cada suspensão com auxílio de Câmara de Neubauer e visualização em microscópio óptico e objetiva de 100X (MURAKAMI *et al.* 2000 modificado).

No transplante, utilizaram-se mudas sadias da cultivar de couve-flor Piracicaba Precoce (Top Seed Garden) e do híbrido Sharon (Sakata), produzidas em bandejas de prolipropileno (primeiro uso) e substrato comercial Plantmax. Efetuou-se o transplante aos 34 dias após o semeio, quando as mudas apresentavam quatro folhas definitivas.

Na adubação de plantio, utilizaram-se 2,34 g/planta de KCl, 3,13 g/planta de ureia e 20,23 g/planta de superfosfato simples, calculados com base nas recomendações técnicas para a cultura e resultados das análises químicas de solo. Na adubação de cobertura utilizaram-se 7,5 g/planta ureia e 5,81 g/planta de KCl aos 20 e 60 DAT. Aos 40 DAT aplicou-se na projeção das copas cerca de 120 g/planta de cama de aviário curtida, conforme prática dos produtores da região. No início do florescimento, aplicou-se com ácido bórico (2 g L⁻¹). Seguiu-se o manejo usual para a cultura na região, irrigação por aspersão e duas capinas manuais.

Observou-se o delineamento de blocos ao acaso em esquema fatorial 2x4, duas cultivares e quatro doses de calcário e quatro repetições. Cada parcela era composta por oito linhas contendo oito plantas cada, em um total de 64 plantas, totalizando 16 m².

Iniciaram-se as colheitas aos 53 dias após o transplante, quando as primeiras inflorescências atingiram ponto comercial que prosseguiu por mais 33 dias. Coletaram-se ao acaso para análise, dez plantas por parcela e determinaram-se o número total de plantas com padrão comercial por parcela. Nas dez plantas coletadas, determinou-se, individualmente: a massa fresca das folhas e do caule e a massa fresca e diâmetro das inflorescências. Para avaliação das raízes, removeu-se o solo aderido e em seguida estas foram fotografadas, pesadas para determinação da massa fresca total, e avaliadas quanto a severidade da hérnia das crucíferas por meio de escala de notas (TAKAHASHI *et al.* 2005), onde 0=0%, 1=25%, 2=50%, 3=75% e 4=100% de raízes infectadas. Em seguida, separaram-se as raízes com galhas das sadias e determinaram-se os respectivos volumes. O volume foi determinado pelo deslocamento de água em uma proveta graduada. Calculou-se a percentagem de raízes com hérnia e de raízes sadias pela razão entre os volumes de raiz com hérnia e sadia e o volume total das raízes, respectivamente.

Durante o período de colheita, contabilizaram-se o número de plantas mortas, subdesenvolvidas e normais por parcela. Como plantas subdesenvolvidas consideraram-se aquelas com folhas raquíticas, emissão precoce de inflorescências ou inflorescências deformadas e, como normais, aquelas com folhas completamente expandidas e inflorescências bem formadas, mesmo que aquém do ponto de colheita.

Uma amostra composta da parcela, com aproximadamente 500g de folha e 300 g de raízes e caules, foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa a 60°C, até peso constante. Em seguida, estas amostras foram pesadas e moídas em moinho analítico IKA modelo A-11 para as posteriores análises químicas visando a determinação dos teores de Ca, Mg, Al, K, Zn, Mn e Cu. Para tanto, tomaram-se alíquotas de 1,0 g dos respectivos órgãos, secos e moídos, que foram digeridos por via úmida em sistema fechado em Digestor MARS Xpress®, pelo o método SW-846 3051A (USEPA, 2007) utilizando 10 mL de HNO₃.

Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram filtrados e diluídos para 50 ml com água milliQ. Os brancos tiveram o mesmo tratamento. As concentrações de Zn, Mn, Fe, Ca, Mg, Al e Cu nos extratos foram determinadas por Espectrometria de Absorção Atômica (equipamento de marca Agilent Technologies, modelo Varian SpectrAA 55B). Os teores de N total (%) foram determinados no Rapid N Cube (marca ELEMENTAR), por combustão, de acordo com a metodologia de Dumas (KEENEY e BREMMER, 1967) e o K por fotometria de emissão de chamas.

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância, teste de médias (Tukey $p < 0.05$) e quando significativos para as doses, realizou a análise de regressão linear ou quadrática ($p < 0,05$).

Quando necessário foi realizada a transformação dos dados. Os dados de magnésio, alumínio e saturação por alumínio no solo; desenvolvimento das plantas (MFF-Massa fresca de folha, MFC- Massa fresca de caule, MFPA- Massa fresca de parte aérea, MFR- Massa fresca de raiz e MFI- Massa fresca de inflorescência) foram transformados por \sqrt{x} , assim como o volume total de raízes e o volume de raízes sadias. Já os dados de MFH- Massa fresca de hérnia, VolH- volume de raiz com hérnia, PRH-percentagem de raiz com hérnia, severidade, número de plantas mortas, subdesenvolvidas e a produtividade foram transformados por $\sqrt{x+1}$. Para todas as análises utilizou o programa estatístico SISVAR.

19. RESULTADOS E DISCUSSÃO

19.1. Registro de temperatura e umidade

Durante o período entre a aplicação do corretivo e transplântio da couve-flor, a precipitação variou de 0 a 60 mm e, durante o ciclo foi de 378,2 mm (Figura 15). Acredita-se, porém, que este volume de precipitação tenha sido suficiente para uma adequada reação do corretivo no solo, especialmente por ser este de reação rápida. Aos 10 dias após o transplântio, registrou-se forte precipitação, cerca de 60 mm, coincidente com temperaturas na faixa de 17-22°C que pode ter favorecido o desenvolvimento inicial da doença.

Rastas *et al.* (2012) relatam que a ocorrência de precipitação alta ou moderada, associada a temperatura mais elevada, no início do ciclo da cultura resultam em maiores severidades da doença. A média da temperatura registrada no período do experimento oscilou entre 15 e 20°C (Figura 15), sendo esta faixa de temperatura adequada para o desenvolvimento da doença (ROSA *et al.* 2010; GOSSEN *et al.* 2013). Segundo Sharma *et al.* (2011a, 2011b) o desenvolvimento da hérnia em *Brassica rapa* subsp. *Chinensis* (“mostarda”) é lento em temperaturas abaixo de 17°C e é muito favorecido sob condições com temperaturas de 23 a 26°C. Abaixo destes valores, e à medida que a temperatura se eleva acima de 30°C, os autores relatam redução da severidade. Este mesmo padrão de resposta foi observado em infecções primárias e intensidade da doença em canola, em ensaio sob condições controladas (GOSSEN *et al.* 2012a).

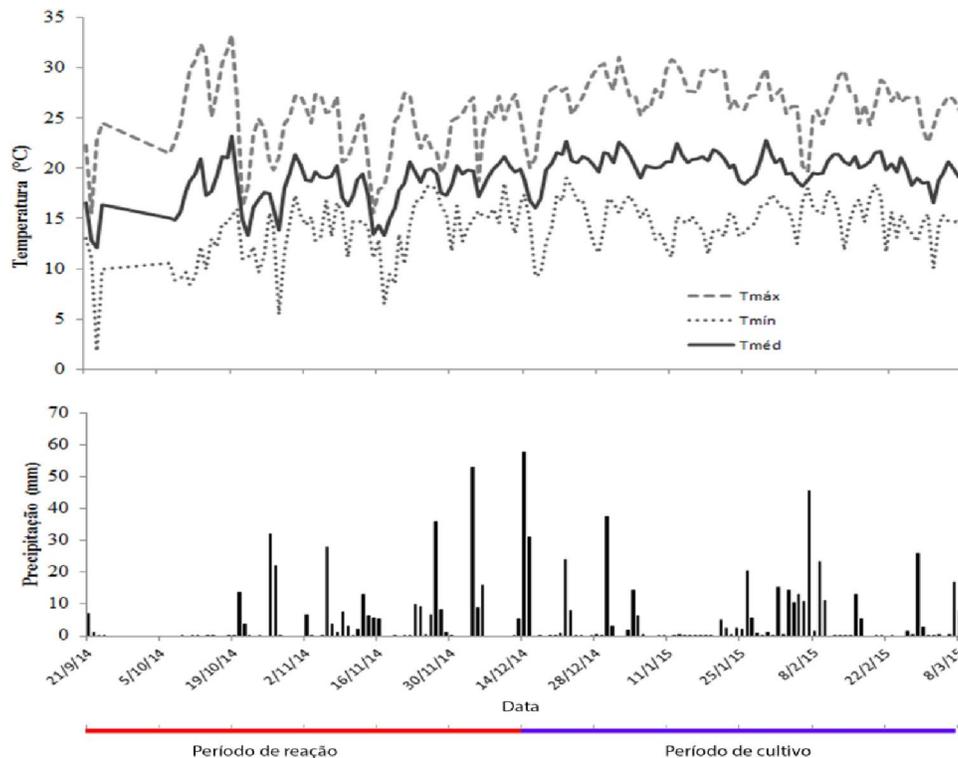


Figura 15: Temperatura (°C), máxima, média e mínima, e precipitação (mm) registrada no período de setembro de 2014 a março de 2015, desde a aplicação das doses de corretivo até a colheita da couve-flor. Nova Friburgo-RJ, 2014/2015.

19.2. Efeito das doses de corretivo sobre a fertilidade do solo

Houve acréscimo dos teores de cálcio no solo com aumento da dose de corretivo (Figura 16). Os teores de Ca+Mg, porém, se situaram acima do recomendado para a cultura, 3,0 cmol/dm³ (GUERRA *et al.* 2013), tendo apresentado os valores de 4,10; 7,27; 8,08 e 9,58 cmol/dm³ nos tratamentos com 0, 1, 2 e 4 t/ha, respectivamente (Figura 16). Ou seja, mesmo no tratamento sem adição de corretivo, os teores de Ca+Mg, estavam de acordo com o recomendado para a cultura e, provavelmente, não limitante à cultura.

Dentre os macronutrientes, apenas o Ca, Mg e o N são tratados na literatura como capazes de influenciar na severidade da hérnia, pouco se conhece sobre a influência direta do fósforo e do potássio sobre o *P. brassicae*. Porém, a maior quantidade desses elementos no solo pode proporcionar um efeito indireto, ocasionando efeitos compensatórios ou pelo favorecimento do desenvolvimento radicular (AVALHÃES *et al.*, 2009; LÓPEZ-BUCIO *et al.* 2003).

Os acréscimos nos teores de cálcio no solo com aumento da dose de corretivo (Figura 16) também não foram suficientes para reduzir a severidade da doença, possivelmente pelo mesmo motivo descrito anteriormente. A ausência de efeito das doses crescentes de Ca pode ainda estar associada ao fato deste não ter sido limitante, mesmo no tratamento testemunha, 0t/ha de corretivo. O Ca é frequentemente citado como sendo um nutriente com efeitos consideráveis na redução das perdas pela doença por afetar diversas fases do ciclo do patógeno por reduzir o número e a taxa de maturação dos esporângios e a eficiência na reprodução do plasmódio primário no interior do pelo radicular. Na rizosfera, este elemento pode influenciar a viabilidade e germinação dos esporos de resistência e a mobilidade dos zoósporos primários (DIXON, 2006, 2009, 2014). Além disso, o cálcio pode afetar também a própria reação da planta e a expressão de fatores de resistência do hospedeiro, por ter um papel crítico na constituição da parede celular (DIXON, 2006).

Quanto ao K trocável, sua disponibilidade só aumentou de forma significativa na maior dose de corretivo (Figura 16D). Avalhães *et al.* (2009) relatam não haver crescimento da raiz da couve-flor sob deficiência de potássio. Sharma (1988) também apontaram a importância do potássio para o crescimento da couve-flor. Assim, acredita-se que o potássio, apesar de não referido como associado ao desenvolvimento de hérnia das crucíferas possa contribuir para a redução das perdas pela doença por favorecer o sistema radicular. Além do mais, a sequência de absorção pela planta de couve-flor em ordem decrescente, para os macronutrientes foi Potássio (K) > Nitrogênio (N) > Cálcio (Ca) > Enxofre (S) > Magnésio (Mg) > Fósforo (P).

Os teores de P assimilável aumentaram com o aumento das doses de corretivo devido à redução da acidez do solo e, conseqüentemente, elevação do P disponível na solução do solo (SOUSA *et al.* 2007). O aumento da disponibilidade de P contribuiu para aumentar a produção de raízes laterais (LÓPEZ-BUCIO *et al.* 2003).

A saturação de bases (V) média nos quatro tratamentos foi de 29,95%, 46,67%, 54,77 e 68,10 para as doses 0,0 1,0 2,0 e 4,0 t/h de corretivo, respectivamente. Estes valores, mesmo no tratamento com 4,0 t/ha ficou aquém do recomendado para a cultura, que é de 80% (MAY *et al.* 2007). A saturação por Al (m) no tratamento testemunha (0,0 t/ha) foi de 5,07%, levemente acima do limite aceitopara a cultura de couve-flor, que é 5,0 (RIBEIRO *et al.* 1999). Os valores de m decresceram com a correção do solo e atingiram valores iguais a 0,00% nos tratamentos com 1, 2 e 4 t/ha de corretivo (Figura 17C).

A aplicação de 2,0 e de 4,0 t/ha de corretivo resultou em ajuste do pH do solo para 6,26 e 6,75 respectivamente (Figura 17B), valores estes dentro da faixa favorável à cultura que é de 6,0 a 6,8 (MAY *et al.* 2007). Todos os tratamentos que receberam a calagem aumentaram o pH para a faixa mínima recomendável para redução das perdas pela hérnia das crucíferas,

acima de 5,7 (SHUTA 2003 e HASSE 2005; WEBSTER e DIXON 1991), com maior valor no tratamento com 4,0 t/ha, 6,75. Este valor de pH foi o mais próximo do valor recomendado como adequado para o controle de h ernia das crucíferas (DONALD e PORTER, 2009; GOSSEN *et al.* 2014).

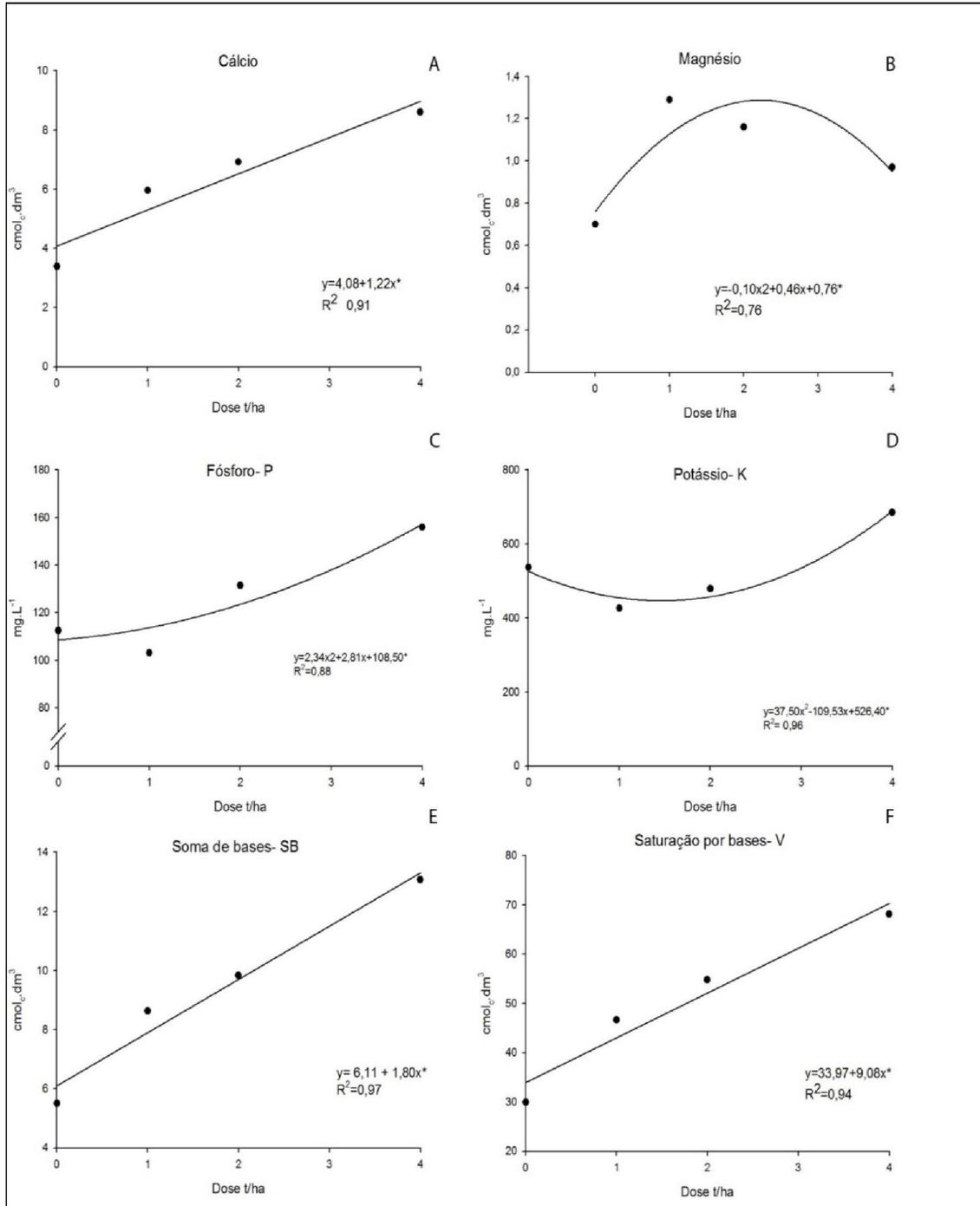


Figura 16. Teores de cálcio (A); magnésio (B); fósforo (C) e de potássio (D); soma de bases (E) e saturac o por bases (F), em fun o das doses de corretivo (calcário parcialmente calcinado com PRNT =104,5%), 90 dias após a aplica o.

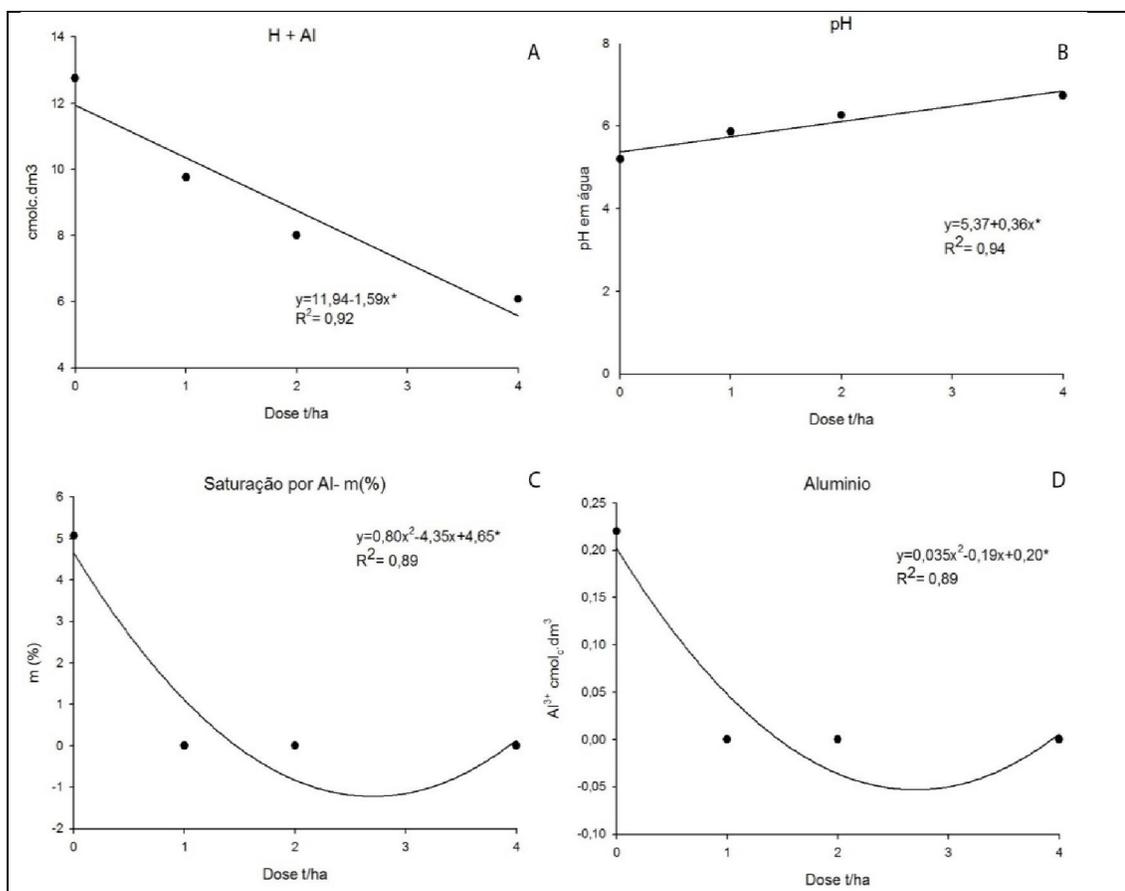


Figura 17: Acidez potencial (A); pH (B); saturação por Al (C) e alumínio trocável (D), em função das doses de corretivo (calcário parcialmente calcinado com PRNT =104,5%), 90 dias após a aplicação.

19.3. Efeito dos tratamentos no desenvolvimento radicular e da hérnia das crucíferas

A massa fresca das raízes total aumentou com o incremento nas doses de corretivo em ambas as cultivares, sendo este efeito mais acentuado em Sharon (Tabela 11 e Figura 18A) e bem ajustado por equação linear simples. Ainda, os valores de massa fresca de raiz total foram sempre significativamente superiores nas plantas de Sharon comparados aos de Piracicaba Precoce (Figura 18A).

Registraram-se maiores volumes de raiz, total e sadia, na cultivar Sharon comparada à Piracicaba (Tabela 11) e nas doses crescentes de corretivo, descrito por equações lineares simples em função da dose de corretivo (Figura 18B e C).

A não detecção de efeito dos tratamentos sobre a severidade da doença, considerando apenas a escala de notas, pode estar relacionada a dificuldades de se quantificar esta doença e à pouca precisão desta avaliação. A severidade, definida como a porcentagem da área ou do volume de tecido lesionado é frequentemente estimada com o uso de escalas (AMORIM, 1995). No caso da hérnia das crucíferas tem sido estimada com o uso de uma escala descritiva, a de Wallenhammar *et al.* (2000) ou, uma escala quantitativa, de Takahashi *et al.* (2005). No presente trabalho utilizou somente a escala de Takahashi *et al.* (2005). No entanto, esta possui poucos níveis de severidade e não permitem discriminar com precisão o efeito dos tratamentos.

Melhores resultados foram obtidos com a medida de volume de raízes total e sadias. Este resultado está parcialmente de acordo com Nutter Jr *et al.* (2006) que afirma ser a quantificação de doenças que causam galhas em caules e raízes ou de podridões em fruto, mais adequada por meio de estimativa ou medidas de volumes ou proporção do volume do órgão afetado. Neste trabalho, observou-se efeito dos tratamentos apenas sobre o volume de raízes total e sadias, com ganhos nos volumes em função do incremento das doses de corretivo (Figura 18 B-C).

Um maior volume de raízes, especialmente sadias, pode aumentar a eficiência das plantas na absorção de água e nutrientes. Ou seja, mesmo que as plantas contenham raízes com galhas, o ganho em volume de raízes sadias pode, até certo ponto, compensar as perdas causadas pela doença. Assim, uma resposta importante para o bom desenvolvimento da planta e redução das perdas pela hérnia das crucíferas pode ser o favorecimento da emissão de raízes pela planta. Acredita-se que condições que possam favorecer uma maior emissão de raízes possam compensar a perda de raízes infectadas. Ou seja, com a elevação do pH do solo e neutralização do Al tóxico há também um efeito indireto positivo como estratégia de manejo da doença que é o favorecimento do desenvolvimento radicular e compensação daquelas raízes comprometidas pela doença.

Além destes aspectos, porém, deve-se considerar que um maior ou menor êxito da calagem depende da característica do produto aplicado, modo de aplicação e eficiência de sua distribuição no solo e da natureza do sistema radicular e do volume de solo efetivamente explorado pela cultura (RAIJ, 2011).

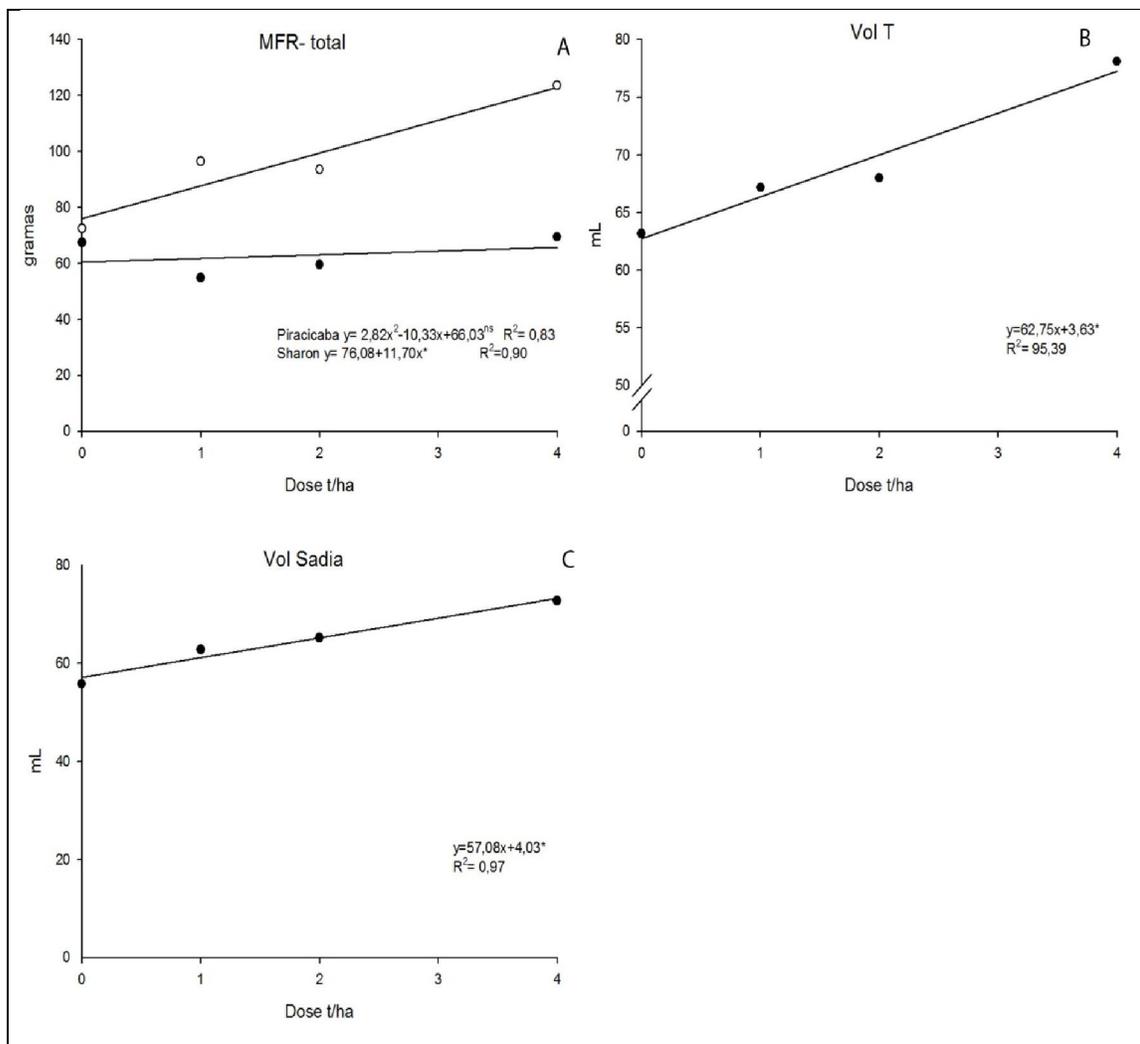


Figura 18: Valores médios massa fresca de raiz (A); volume total de raízes (B) e volume de raízes sadias (C), em duas cultivares de couve-flor, em função das doses de corretivo aplicado (calcário parcialmente calcinado com PRNT = 104,5%).

Tabela 11. Valores médios de massa da matéria fresca total de raízes; volume total de raiz e volume de raiz sadia, observadas na híbrido Sharon e na cultivar Piracicaba.

Cultivar	MFR-total	Volume total de raiz (mL)	Volume de raiz sadia (mL)
Sharon	96,56 a	79,84 a	74,37 a
Piracicaba	62,77 b	58,38 b	53,93 b
CV(%)	21,48	19,99	22,85

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A ausência de efeito dos tratamentos sobre a massa e volume de raízes com galhas pode também estar relacionada ao alto potencial de inóculo no solo, acima de 10^8 esporos/grama de solo (Figura 19). Falhas no controle da hérnia têm sido frequentemente atribuídas ao alto potencial de inóculo no solo e a questões como método de aplicação e incorporação do calcário,

características do produto, eficiência da distribuição de suas partículas e umidade e textura do solo (DONALD e POTER 2009).

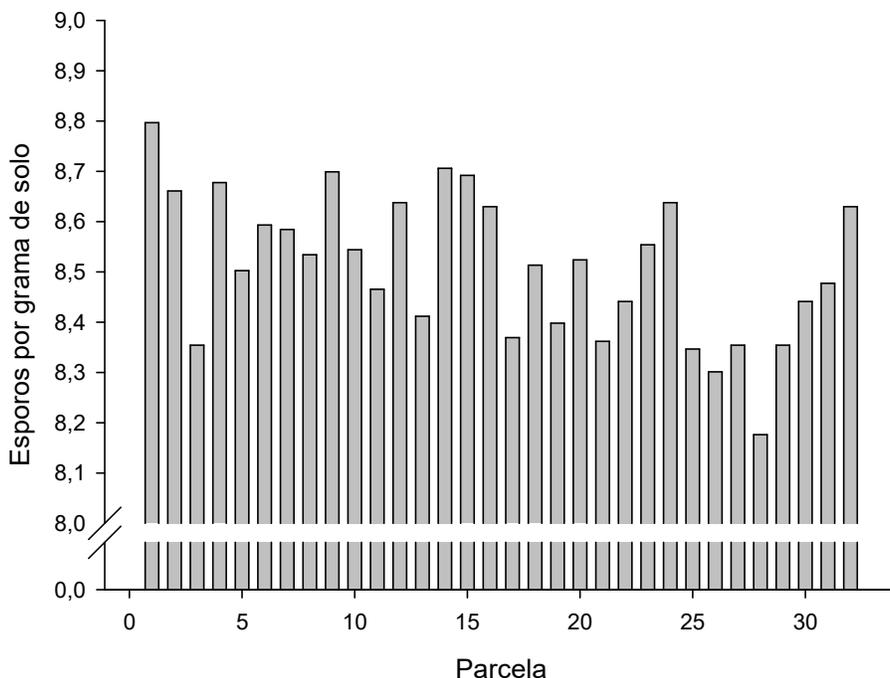


Figura 19: Número de esporos de resistência de *Plasmodiophora brassicae* registrados nas diferentes parcelas (log número de esporos/g de solo).

Segundo Myers *et al.* (1981), o pH e a concentração de inóculo do patógeno no solo afetam de forma interativa diferentes processos no ciclo de vida do patógeno como invasão e colonização das células e o desenvolvimento dos sintomas. Webster & Dixon (1991) verificaram que o efeito do pH no controle da doença foi mais efetivo em baixas concentrações de inóculo do patógeno. Ainda, segundo Ruaro *et al.* (2010), em solos altamente infestados, o uso da calagem pode ser falho para controlar a doença.

19.4. Efeito das doses sobre desenvolvimento das plantas e das inflorescências

Observou-se efeito de cultivar sobre o acúmulo de massa fresca de todos os órgãos da planta (Tabela 12), e constatou incrementos de massa fresca de caule e total em resposta aos aumentos de dose de corretivo e maiores acúmulos em Sharon comparados à Piracicaba Precoce em todas as doses (Figura 20 A-C). O acúmulo de massa fresca da parte aérea aumentou com a dose de corretivo, independente da cultivar (Figura 20D).

Tabela 12. Valores médios de massa de matéria fresca de folha (MFF), de massa de matéria fresca de caule (MFC), de massa de matéria fresca de parte aérea (MFPA), de massa de matéria fresca total (MFT), observadas no híbrido Sharon e na cultivar Piracicaba.

Cultivares	MFF	MFC	MFPA	MFT
Sharon	1270,39 a	277,66 a	2053,04 a	45,79 a
Piracicaba	850,88 b	151,30 b	1471,64 b	38,33 b
CV(%)	22,43	17,14	18,31	17,95

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

O aumento no ganho de massa pode estar relacionado com aumento da disponibilidade de P com a correção do solo, e com o aumento do volume de raízes, total e sadia (Figura 16C e Figura 18B-C). As plantas de couve-flor apresentam crescimento das raízes até a profundidade de 85 a 115 cm, porém tendem a apresentar maior crescimento horizontal que vertical e maior exploração da camada superficial do solo com intensa ramificação e produção de pelos radiculares nas camadas superficiais (THORUP-KRISTENSEN E BOOGAARD, 1998).

Avalhães *et al.* (2009) cita que plantas de couve-flor suprimidas de fósforo, apresentaram diminuição do número de folhas, altura, diâmetro do caule, bem como área foliar em relação ao tratamento completo. Enfatizando com estes resultados a importância da correção do solo para a disponibilidade de fósforo e o bom desenvolvimento da planta e consequente, acúmulo de massa.

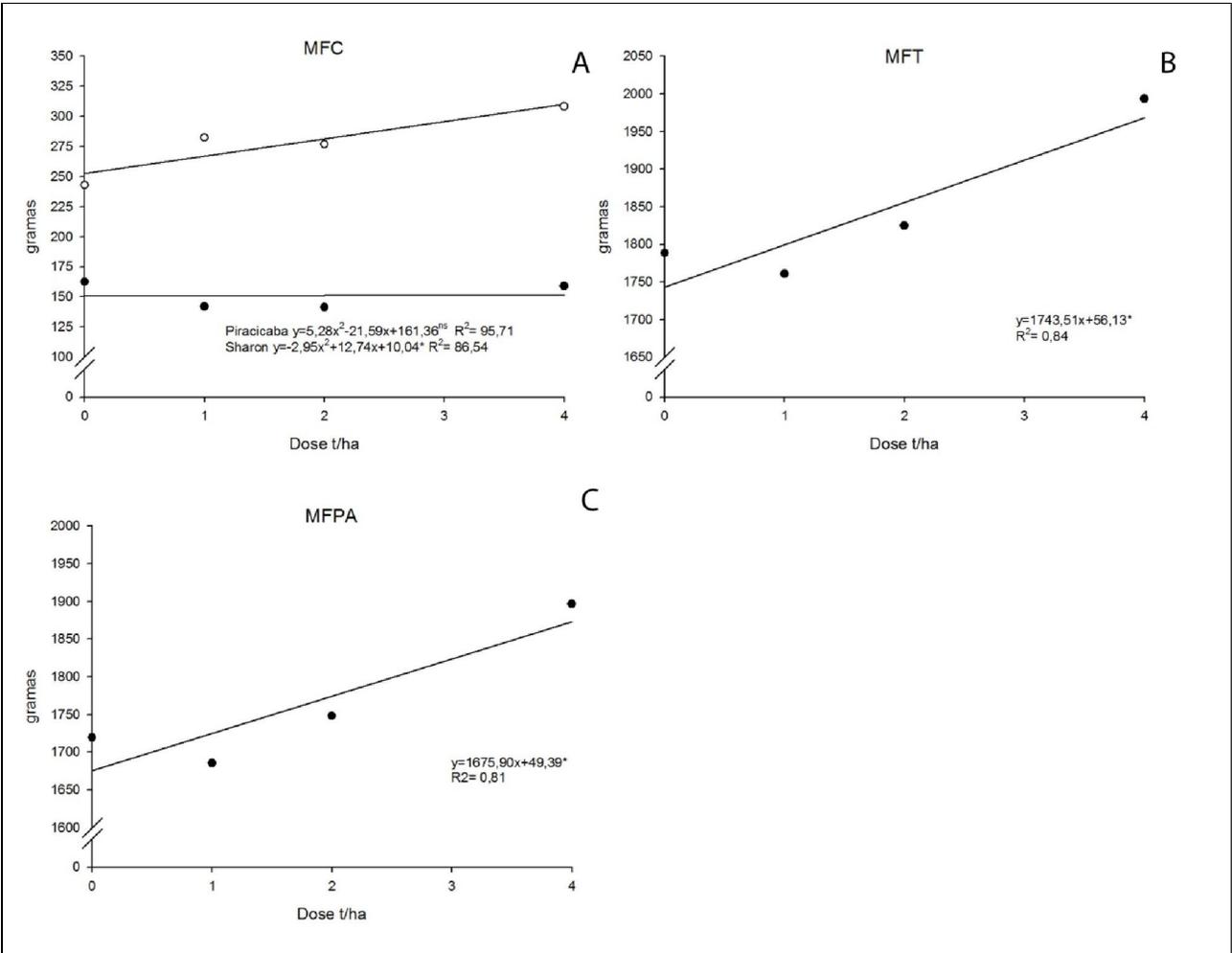


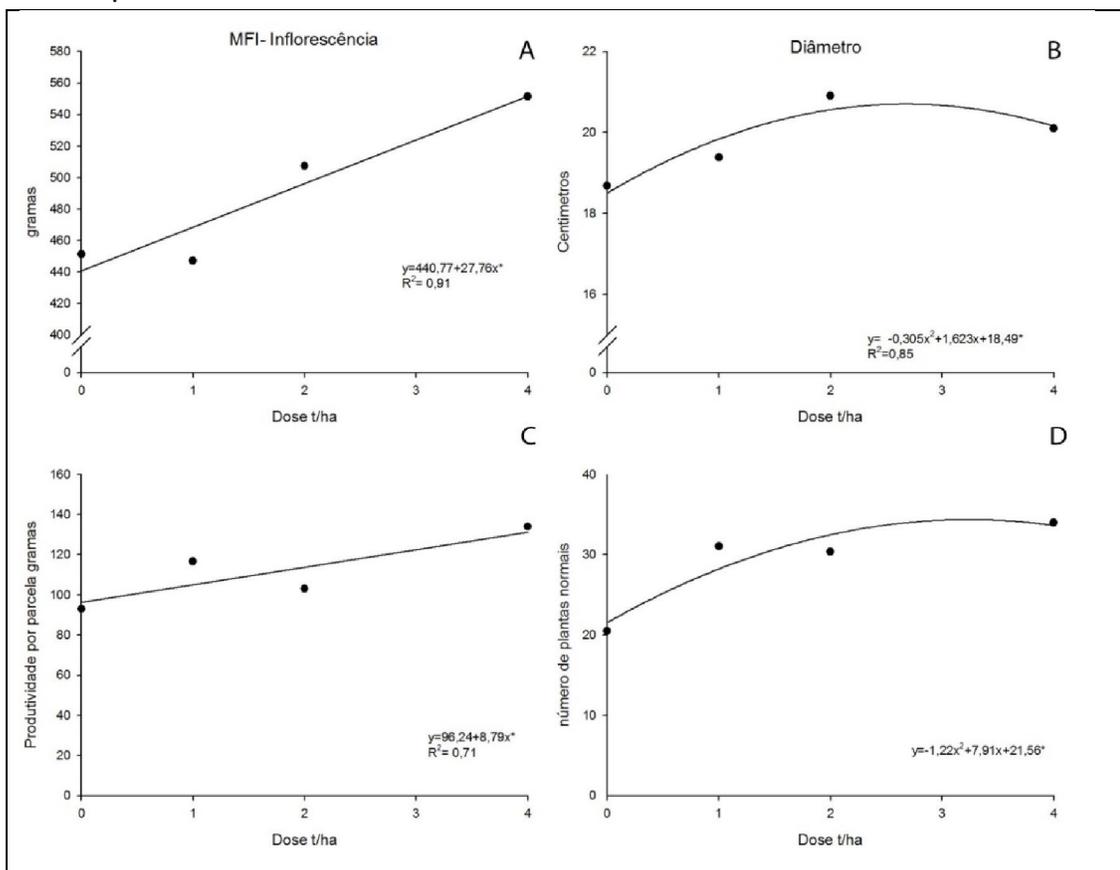
Figura 20: Valores médios massa fresca de caule - MFC (A); massa fresca total - MFT (B), massa fresca de parte aérea - MFPA (C), em plantas das cultivares Sharon e Piracicaba Precoce em função das doses de calcário (calcário parcialmente calcinado com PRNT = 104,5%).

19.5. Produtividade e qualidade

Observou-se efeito significativo de dose e de cultivar no acúmulo de massa fresca e diâmetro das inflorescências de couve-flor com aumento tanto da massa fresca como do diâmetro das inflorescências em função do aumento da dose de corretivo (Figura 21 A-B) e maiores valores em Sharon, comparado à Piracicaba Precoce. Os ganhos em massa e diâmetro implicaram em ganho de qualidade, visto ser o diâmetro transversal um atributo importante na classificação comercial de couve-flor (PROGRAMA HORTI e FRUTI PADRÃO, 1999).

Observou-se, ainda, efeito significativo de dose sobre número de plantas normais e produtividade por parcela. Houve acréscimo significativo de produtividade com as doses, decorrente tanto do aumento do número de plantas normais como do aumento da massa média das inflorescências (Figura 21). Pode-se notar, ainda, que a aplicação de apenas 1 t/ha de corretivo resultou em aumento expressivo do número de plantas normais e de produtividade em relação à testemunha, 0 t/ha, e com menores acréscimos nas doses de 2,0 e 4,0 t/ha. Este

resultado deve-se à melhoria das condições de fertilidade do solo e, provavelmente, ao aumento do volume de raízes sadias pelas plantas.



19.6. Concentração e acúmulo de nutrientes

Não houve diferença significativa, tanto para cultivar quanto para dose, na concentração de nutrientes na parte aérea e na inflorescência.

Verificou-se efeito significativo de cultivar nos valores de N, K, Mg acumulados na parte aérea e nenhum efeito de dose. As plantas da cultivar Sharon apresentaram maior acúmulo de Mg e K na parte aérea (Tabela 13).

Dentre os micronutrientes, observou-se, efeito de cultivar sobre o acúmulo de Zn e Mn na parte aérea e Fe na inflorescência, com maior acúmulo Fe na inflorescência de Piracicaba e de Zn na parte aérea de Sharon (Tabela 13). Castoldi *et al.* (2009) e Souza *et al.* (2007) citam a ordem decrescente de acúmulo de micronutrientes pela couve-flor ‘Verona’ de Fe>Mn>Zn>Cu, semelhante ao encontrado neste estudo.

Tabela 13. Valores médios de Macro e micronutrientes acumulados na inflorescência e acumulado na parte aérea de plantas de couve-flor das cultivares Sharon e Piracicaba Precoce.

Cultivar	Acumulado na inflorescência				Acumulado na Parte aérea			
	N	K	Ca	Mg	N	K	Ca	Mg
g.....			g.....			
Sharon	0,10 A	0,006 A	8,29 A	2,15 B	42,76 A	2,89 A	4,25 A	1,22 A
Piracicaba	0,12 A	0,006 A	5,65 A	2,78 A	33,67 B	2,08 B	3,91 A	0,95 B
CV(%)	7,79	16,94	32,34	17,65	19,89	2,45	15,3	6,96
Cultivar	Cu	Zn	Fe	Mn	Cu	Zn	Fe	Mn
mg.....			mg.....			
Sharon	0,002 A	0,10 A	0,17 B	0,04 B	4,68 A	43,74 A	652,57 A	24,56 A
Piracicaba	0,002 A	0,08 A	0,25 A	0,05 A	3,69 A	31,99 B	525,88 A	18,76 B
CV(%)	13,15	15,99	23,80	13,26	25,89	11,14	30,82	9,64

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 10% de probabilidade.

20. CONCLUSÕES

1. A calagem favoreceu o desenvolvimento e proporcionou ganhos de biomassa, de produtividade e de qualidade de couve-flor, mesmo sem ter reduzido significativamente a severidade da hérnia das crucíferas;
2. A calagem não reduziu a formação de galhas, mas favoreceu a emissão de raízes pelas plantas de couve-flor;
3. As plantas da cultivar Sharon responderam melhor à calagem que as da Piracicaba Precoce.

21. REFERÊNCIAS

- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Brasil, 2016. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em 26 de janeiro de 2016.
- AMORIM, L. **Avaliação de doenças**. In: Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 647–671.1995.
- ARAÚJO, M.A.; SOUZA, J.L.M.; LIMA NETO, V.C.; BRONDANI, B.E. Estimativa da incidência e severidade da hérnia das crucíferas em função do pH do solo. **Scientia Agraria**, v.10, n.6, p.499-505, 2009.
- AYERS G.W. Studies on the life history of the club root organism, *Plasmodiophora brassicae*. **Canadian Journal of Research**. 22, 143–9. 1944.
- AVALHAES, C. C., PRADO, R. M., CORREIA, M. A. R., ROZANE, D. E., E ROMUALDO, L. M. Avaliação do estado nutricional de plantas de couve-flor cultivadas em solução nutritiva suprimidas de macronutrientes. **Nucleus**. 2009.
- CASTOLDI, R., CHARLO, H. C. D. O., VARGAS, P. F., & BRAZ, T. Crescimento, acúmulo de nutrientes e produtividade da cultura da couve-flor. **Horticultura Brasileira**, 438-446. 2009.
- COSTA H. E VENTURA J.A. **Hérnia das Crucíferas**. INCAPER.2^a ed. p.4.<http://www.incaper.es.gov.br/sistemas/servicos/imagens/HerniaCruciferas.pdf>. Acessado em 01/04/2016.
- DIXON, G. E. Clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) – an agricultural and biological challenge worldwide. **Canadian Journal of Plant Pathology**. 36:5-18. 2014.
- DIXON GR. *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 28, n. 3, p. 212-228, 2009a.
- DIXON, G.R. The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor. a review of recent advances. **Acta-Horticulturae**, v. 706, p. 271-282, 2006.
- DONAGEMMA, G.K, CAMPOS, D.V.B DE., CALDERANO, S.B., TEIXEIRA, W.G., E VIANA J.H.M. **Manual e métodos de análise de solo**. 2nd ed. Embrapa solos, Rio de Janeiro, RJ. 2011.
- DONALD, C. & PORTER, I. Integrated control of clubroot. **Journal Plant of Growth Regulation**, 28:289–303. 2009
- DONALD EC, LAWRENCE JM, PORTER IJ. Influence of particle size and application method on the efficacy of calcium cyanamide for control of clubroot of vegetable brassicas. **Crop Protection**. 23:297–303.2004.
- DONALD EC, PORTER IJ, LANCASTER RA. Strategic application of lime, fertilisers and fungicides for improved control of clubroot. **Cruciferae Newsl**. 24:81–82. 2002.

GOSSEN B.D., DEORA A., PENG G., HWANG S. E MCDONALD M.R. Effect of environmental parameters on clubroot development and the risk of pathogen spread. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 36:sup1, 37-48.2014.

GOSSEN BD, KASINATHAN H, CAO T, MANOLII VP, STRELKOV SE, HWANG SF, MCDONALD MR. Influence of pH and temperature on infection and symptom development of clubroot in canola. **Canadian Journal of Plant Pathology**. 35:294–303. 2013.

GOSSEN, B.D., ADHIKARI, K.K.C., & MC DONALD, M.R. Effects of temperature on infection and subsequent development of clubroot under controlled conditions. **Plant Pathology**, 61, 593–599. 2012a.

GLUDOVACZ T. V. **Clubroot in Canola and Cabbage in Relation to Soil Temperature, Plant Growth and Host Resistance**. [dissertation]. Guelph(ON): University of Guelph. 2013.

GUERRA, J. G. M., LEAL, M. A. de A., FERREIRA, M. B. C. **Recomendações de adubos e corretivos e de manejo da matéria orgânica para as principais culturas de Estado do Rio de Janeiro**.p. 303-304 em: Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro. Editora Universidade Rural, Seropédica. 2013.

HASSE, I. **Quantificação de *Plasmodiophora brassicae* e uso de plantas medicinais para controle da doença**. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2005.

HASSE, I., MAY DE MIO, L. L., LIMA NETO, V. C. Efeito do pré-plantio com plantas medicinais e aromáticas no controle de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 74-79. 2007.

HORIUCH, S., HORI, M. A. simple greenhouse technique for obtaining levels of clubroot incidence. **Bulletin of the Chugoku National Agricultural Experiment Station**, E17, 33 e 35. 1980.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Balanço hídrico climático. www.inmet.gov.br/html/agro. (acessoem 01.12.2015)

KONG KAW WA, S. **Discovering clubroot resistance genes in *Brassica* vegetable crops**. Ph.D. Tese, RMIT University, Melbourne, Austrália. 2009.

KURAMOTO, M.; OLIVEIRA, G.D.C.; HAAG, H.P.; MINAMI, K. Deficiências de micronutrientes em couve-flor. In: HAAG, H.P.; MINAMI, K., (Ed.). **Nutrição mineral em hortaliças**, p.117-130. 1981.

MAY, A.; TIVELLI, S.; VARGAS, P.; SAMRA, A.G.; SACCONI, L.V.; PINHEIRO, M.Q. **A cultura da couve-flor**. Campinas: Instituto Agronômico/Fundação IAC, 2007. (Boletim técnico, 200). Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes_online/pdf/Tecnico200.pdf. Acesso em 12 de janeiro 2016.

MARINGONI, A. C. **Doenças das crucíferas: brócolis, couve, couve chinesa, rabanete, repolho e rúcula**. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.

E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de fitopatologia: volume 2: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, p. 315-324, 1997.

MYERS, D.F.; CAMPBELL, R.N.; GREAT HEAD, A.S. Clubroot of crucifers in California: Soils respond differently to lime from clubroot control. **Phytopathology**, v.71, p.1005 – 1006. 1981.

MURAKAMI, H.; TSUSHIMA, S.; AKIMOTO, T.; MURAKAMI, K.; GOTO, I.; SISHIDO, Y. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology**, v. 49, n. 5, p. 584-589. 2000.

MURAKAMI, H.; TSUSHIMA, S.; KUROYANAGI, Y.; SHISHIDO, Y. Reduction of resting spore density of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease severity by liming. **Science and plant nutrition** 48:685–691. 2002.

NARISAWA, K.; SHIMURA, M.; USUKI, F.; FUKUHARA, S.; HASHIBA, T. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in Chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. **Plant Disease**, v. 89, p. 285–290. 2005.

NUTTER Jr., F.W.; ESKER, P.D. & NETTO, R.A.C. Diseases assessment concept and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. **European Journal of Plant Pathology**, v.115 p.95-103. 2006.

PENALBER, A.T.T; **Controle alternativo da hérnia das crucíferas causada por *Plasmodiophora brassicae* em brócolis através de composto orgânico**. Tese: Departamento de fitopatologia, Instituto de ciências biológicas Universidade Federal de Brasília. 2009.

PROGRAMA HORTI & FRUTI PADRÃO. **Classificação da couve-flor**. 1999.

RIBEIRO, A.C.; GUIMARAES, P.T.G.; ALVAREZ V., V.H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 359p. 1999.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: IPNI, 420 p.2011.

RASHID A, AHMED HU, XIAO Q, HWANG SF, STRELKOV SE. Effects of root exudates and pH on *Plasmodiophora brassicae* resting spore germination and infection of canola (*Brassica napus* L.) root hairs. **Crop Protection**. 48:16–23. 2013.

RASTAS M, LATVALA S, HANNUKKALA A. Occurrence of *Plasmodiophora brassicae* in Finnish turnip rape and oilseed rape fields. **Agricultural and Food Science** 21:141–158. 2012.

ROSA, D. D.; BASSETO, M. A.; FURTADO, E. L. Efeito da temperatura sobre a severidade de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p.240-243. 2010.

RUARO, L., LIMA NETO, V.C.; MOTTA, A.C.V. Efeito do pH do solo em diferentes níveis de inóculo no controle de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.16-20.2010.

RUARO, L.; NETO, V. C. L.; JÚNIOR, P. J. R. Influência do boro, de fontes de nitrogênio e do pH do solo no controle de hérnia das crucíferas causada por *Plasmodiophora brassicae*. **Tropical Plant Pathology**, Vol. 34, 4, 231-238. 2009.

SHARMA K, GOSSEN BD, MCDONALD MR. Effect of temperature on primary infection by *Plasmodiophora brassicae* and initiation of clubroot symptoms. **Plant Pathology**, 60:830–838. 2011a.

SHARMA K, GOSSEN BD, MCDONALD MR. Effect of temperature on cortical infection by *Plasmodiophora brassicae* and clubroot severity. **Phytopathology**. 101:1424–1432. 2011b.

SCHUTA, L. R. **Boro, nitrogênio, concentração de inóculo e pH no controle da *Plasmodiophora brassicae***. Tese doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2003.

SOUSA, D.M.G. de; e OLIVEIRA, S. A. **Acidez do solo e sua correção**. p. 205-274 em: Fertilidade do Solo. SBCS, Viçosa.2007.

TAKAHASHI, H.; CEBRIAN, I.T.; SOUZA, N.L. Inoculação de *Plasmodiophora brassicae* agente causal da "hérnia das crucíferas". **Summa Phytopathologica**, v. 31, supl., p. 16. 2005.

THORUP-KRISTENSEN, K., e BOOGAARD, R. Temporal and spatial root development of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.). **Plant and Soil**, 201: 37–47.1998.

WALLENHAMMAR A.C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. **Plant Pathology**, 45, 710–9.1996.

WEBSTER, MA.; DIXON, G.R. Calcium, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae* e **Mycological Research**, Amsterdam, v.9 5 , n.1 , p.80-8 5. 1991.

USEPA. United States Environmental Protection Agency-USEPA; SW-846: test methods for evaluating solid waste, physical and chemical methods. 1998.

WALLENHAMMAR A. C., JOHNSON L., and GERHARDSON, B. Agronomic performance of partly clubroot-resistant spring oilseed turnip rape lines. **Journal of Phytopathology**, 148:495–9. 2000.

CAPÍTULO V

EFEITO DO ALUMÍNIO E *Plasmodiophora brassicae* NA ANATOMIA RADICULAR E CRESCIMENTO DE COUVE-FLOR

RESUMO

A hérnia das crucíferas é uma doença causada pelo protozoário *Plasmodiophora brassicae* (Woronin), parasita obrigatório e habitante do solo, e tem como sintomas formação de galhas nas raízes. Existe um consenso na literatura de que o pH ácido é a condição preponderante no desencadeamento e desenvolvimento da infecção do pelo radicular pelo patógeno. Inexistem, porém trabalhos relacionando a acidez trocável e o desenvolvimento da hérnia das crucíferas. O presente trabalho tem como objetivos avaliar, em sistema hidropônico, os efeitos de três doses de alumínio sobre: a) o desenvolvimento das raízes e de plantas de couve-flor; b) as infecções das raízes por *P. brassicae*; c) a relação entre o alumínio e o patógeno no desenvolvimento radicular das plantas; d) caracterizar os danos do alumínio às raízes de couve-flor em microscopia ótica. Avaliou-se o efeito de três doses de alumínio (0, 30 e 60 $\mu\text{M.L}^{-1}$) e de dois valores de pH (4,3 e 6,3) em plantas inoculadas, ou não, com *P. Brassicae*. Utilizaram-se plantas da cultivar Verona, conduzidas durante 35 dias em vasos de 2,5 L contendo solução nutritiva, em ambiente sob tela sombrite com bloqueio de 50% da luz incidente. O pH da solução foi ajustado diariamente, de acordo com o tratamento, com HCl 0,01N, e a solução trocada a cada cinco dias para garantir a presença do alumínio na solução. O alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) foi adicionado aos vasos uma semana após o transplante e sempre que o pH excedia o valor de 4,8. A inoculação foi realizada com a adição de 6,0 mL de suspensão de esporos de *P. brassicae* por vaso. Avaliou-se a biomassa fresca e seca, o volume total de raízes, e os volumes de raízes sadias e doentes. Determinou-se o alumínio e cálcio no tecido vegetal e fez-se análise microscópica da raiz. O alumínio reduziu o comprimento de parte aérea, a concentração e acúmulo de cálcio nas folhas e raízes. O alumínio ocasionou má formação da lamela média e danos na parede celular. O patógeno reduziu o comprimento de raiz e o volume de raiz sadia e aumentou a concentração de cálcio e as divisões celulares nas raízes.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *botrytis*; hérnia das crucíferas; fitotoxidez; parede celular.

22. INTRODUÇÃO

A hérnia das crucíferas é uma doença causada pelo protozoário *Plasmodiophora brassicae* (Woronin), parasita obrigatório e habitante do solo. As infecções e colonização pelo patógeno se dão nos pelos radiculares e córtex das raízes de diferentes espécies da família *Brassicaceae* (DIXON 2009b). O sintoma típico caracteriza-se pela formação de galhas resultante de divisão celular desordenada e do aumento do tamanho das células do córtex da raiz. Dependendo da intensidade doença têm-se uma correspondente redução do processo de absorção de água e nutrientes pelas raízes e, conseqüentemente, prejuízo ao crescimento da planta, murchas temporárias e, em casos mais severos, morte da planta (DIXON 2009a, KAGEYAMA E ASANO 2009, HWANG *et al.* 2011).

A doença é favorecida por solos ácidos com pH <5,5 (DONALD E PORTER 2009; GOSSEN *et al.* 2014), baixos níveis de cálcio (DIXON, 2009), de boro (DIXON, 2009; DEODORA *et al.* 2011) e alta umidade no solo (DIXON 2009b, RASTAS *et al.* 2012). Ainda, temperaturas de 20 a 26°C (SHARMA *et al.* 2011a, 2011b; GOSSEN *et al.* 2013) e áreas com alta densidade e distribuição de esporos de resistência do patógeno são condições favoráveis a severas perdas, pelo ataque do patógeno.

A couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) está entre as espécies suscetíveis (DIXON 2009) e com relatos frequentes de perdas pela doença no Brasil (ARAÚJO *et al.* 2010). Trata-se de uma cultura exigente em fertilidade do solo e que produz melhor em solos com saturação de bases acima de 70%, pH entre 6,0 até 6,8 e teor de Mg + Ca de no mínimo 3,0 cmol/dm³ (GUERRA *et al.* 2013) e sensível ao alumínio tóxico (MAY *et al.* 2007).

Segundo Agrios (2005), o pH ácido é a condição preponderante no desencadeamento e desenvolvimento da infecção do pelo radicular por *P. brassicae*, e com frequência é verificada uma relação inversa entre pH do solo e severidade da hérnia (DONALD E PORTER 2009; GOSSEN *et al.* 2014). Niwa *et al.* (2008) relata que valores neutros de pH inibem a germinação dos esporos de resistência e este é um fator primário para supressão da doença.

O alumínio geralmente provoca severas mudanças na morfologia da raiz, sendo observada inibição do alongamento radicular, resultando em raízes mais curtas com os ápices mais grossos, com poucos ou nenhum pelo radicular (GUPTA *et al.*, 2013). Ainda tem como efeito a interferência na absorção, transporte e utilização de elementos como Ca, K, P e Mg, bem como da água (FOY *et al.* 1978; WAGATSUMA *et al.* 1987).

Existem poucos trabalhos na literatura indicando os danos que este causa em brássicas. Dos Santos *et al.* (2010) relatou que o crescimento das plantas de rúcula foi significativamente reduzido na presença do alumínio (AlCl₃) em condições de solução nutritiva. E em canola (*B. napus*) concentrações de alumínio acima de 60 mM inibiu fortemente o crescimento radicular (CLUNE E COPELAND 1999).

Apesar de a couve-flor ser citada como intolerante ao alumínio tóxico, poucos são os trabalhos mostrando os efeitos fitotóxicos desse elemento em plantas de couve-flor. Ainda, apesar da muito bem conhecida relação entre acidez do solo e fitotoxicidade por alumínio (em solos com pH <5,5) (SOUSA *et al.* 2007) e da acidez do solo com a severidade da hérnia (pH <5,5) (DONALD E PORTER 2009; GOSSEN *et al.* 2014), não existe até o momento nenhum estudo investigando a relação entre danos pelo alumínio e infecção por *P. brassicae* em raízes de *Brassica* spp. Assim, tendo em vista as informações sobre os danos de alumínio às raízes, questiona-se se esses danos não poderiam potencializar as infecções por *P. brassicae*. Especula-se aqui se as lesões e a desorganização da parede celular causada pelo excesso de alumínio no solo, poderiam contribuir ou favorecer o processo de penetração das células dos pelos radiculares e do córtex das raízes pelo patógeno. Ou, ainda, se a redução dos pelos absorventes

e do sistema radicular pelo efeito fitotóxico do alumínio (MEURER *et al.* 2007) não seria um fator agravante para as perdas pela hérnia em solos ácidos.

O cultivo hidropônico pode ser utilizado nos estudos de alterações morfológicas e anatômicas e histológicas sob a ação de elemento tóxico, como ao alumínio. A grande vantagem de emprego de soluções nutritivas nesse caso é o fácil acesso às raízes (MARTINEZ E CLEMENTE 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivos avaliar, em sistema hidropônico, os efeitos de três doses de alumínio e dois níveis de pH sobre: o desenvolvimento das raízes e de plantas de couve-flor; as infecções das raízes por *P. brassicae* e caracterizar os danos do alumínio às raízes de couve-flor em observações sob microscopia ótica.

23. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa, no período de 10 de outubro a 23 de novembro de 2016. Foram avaliados três doses de alumínio (0, 30 e 60 $\mu\text{M.L}^{-1}$), dois valores de pH (4,3 e 6,3) em plantas inoculadas ou não com *P. Brassicae*. Adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições constituídas por uma planta cada.

A condução das plantas de couve-flor foi realizada em vasos 2,5 L contendo solução nutritiva e mantidos sobre uma bancada instalada a 1,00 m do solo e coberta com tela tipo sombrite com bloqueio de 50% da radiação incidente. A solução nutritiva foi composta de N=3; P=0,01; K= 2,9; Ca=1,8; Mg=1; S=3,2 mmol.L^{-1} e, B=46,3; Cu=0,3; Fe=60; Zn= 0,76; Mn=9,11; Mo=0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ na forma dos seguintes sais: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , K_2SO_4 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , para os macro e H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2MoO_4 , Fe-EDTA para os micronutrientes.

Mudas de couve-flor, cultivar Verona, com 20 dias após a semeadura em substrato comercial (Tropstrato), tiveram suas raízes lavadas e, em seguida, transplantadas para vasos contendo a solução nutritiva aerada. A fixação das mudas foi feita em placas de isopor com 20 mm de espessura (Figura 22A). O sistema de aeração foi acionado por um compressor no qual se um acoplou filtro para retenção de impurezas. As mangueiras de aeração dos vasos eram transparentes e foram posicionadas na lateral do vaso. A aeração era contínua e a reposição da água evapotranspirada foi realizada antes do ajuste do pH pela adição de água deionizada (MATINEZ E CLEMENTE 2011). O pH de cada vaso foi ajustado diariamente, de acordo com o tratamento, com HCl 0,01 mol/L. A solução nutritiva dos vasos foi trocada a cada cinco dias.

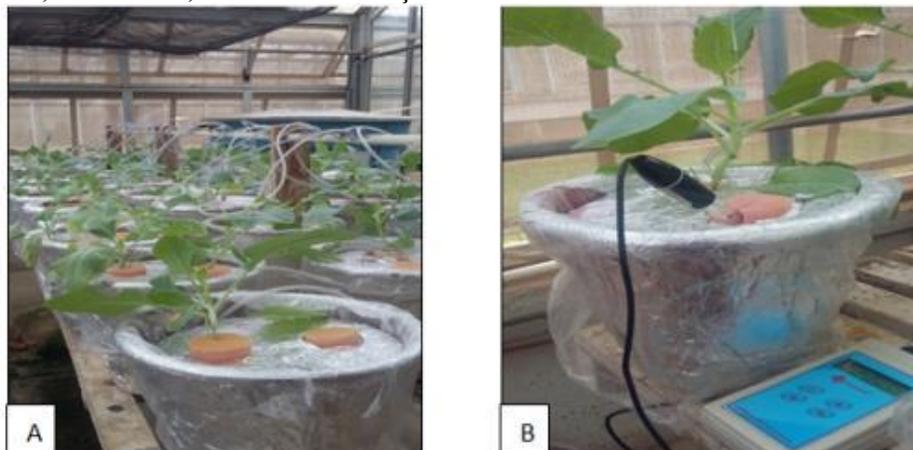


Figura 22: **A:** Visão geral do sistema de condução do experimento; **B:** Medição de pH no vaso.

O alumínio foi adicionado aos vasos uma semana após do transplante, na ocasião da troca de solução nutritiva e, sempre que o pH se elevava para valores acima de 4,8. Utilizou-se alumínio na forma de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$).

As plantas foram inoculadas com adição de 6,0 mL por vaso de suspensão de esporos de resistência de *P. brassicae*, aos três dias após a aplicação do alumínio, 11 dias após o transplante. A suspensão foi preparada a partir de 1 grama de galhas congelada, trituradas e filtradas em quatro camadas de mousseline e avolumada para 50 mL. Em todas as trocas de solução foi adicionada suspensão de esporos nos tratamentos com presença do patógeno.

23.1. Desenvolvimento da planta e atributos de raiz

Aos 35 dias após a inoculação, foram realizadas medidas de comprimento de parte aérea e comprimento total das raízes. Também realizou-se a pesagem, em balança de precisão, para obtenção da massa fresca das folhas, caules e raízes. Em seguida, separaram-se as raízes com galhas das sadias e determinaram-se as respectivas massas frescas e volumes. Determinou-se o volume de raízes sadias e com hérnias através da aferição do volume de água deslocado em uma proveta graduada. Calculou-se a percentagem de raízes com hérnia e de raízes sadias pela relação entre os volumes de raiz com hérnia e sadia e o volume total das raízes, respectivamente. Posteriormente, os diferentes órgãos das plantas (folhas, caules e raízes) foram secos em estufa com circulação forçada à 65°C e pesados para obtenção da massa seca.

23.2. Determinação de alumínio e cálcio nas folhas e raízes

Para a determinação dos valores de alumínio e de cálcio nas amostras de folhas e raízes, foi usada a metodologia da EPA 3050, descrito por USEPA (2008). Pesou-se 1,0 g da amostra de folha e 0,5g da de raiz, ambos secos e moídos em moinho tipo Wiley. Após pesagem, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio e foram adicionados 5,0 mL de HNO₃ concentrado. A seguir, o material foi mantido por 15 min em bloco digestor a 95°C. Após este tempo, foram acrescidos 10 mL de HNO₃ concentrado, levando-se novamente ao bloco digestor a 95°C por mais 2 h. Após essa etapa, adicionaram-se 5 mL de H₂O₂ e, ao cessar a efervescência, o produto da digestão foi avolumado para 25 mL com água destilada e filtrados, dando origem a extratos que posteriormente foram lidos em aparelho de espectrofotometria de absorção atômica (EAA), marca Perkin Elmer, modelo OPTIMA 3000, para determinação das concentrações de cálcio na folha e na raiz e alumínio na raiz. Para validação da determinação do teor de cálcio, e alumínio, utilizou-se a amostra certificada “SRM 1573a - Tomato Leaves” como material de referência. Esta apresenta concentrações de cálcio igual a 50,5 ± 0,9 g kg⁻¹ e de Al igual a 598 ± 12,0 mg kg⁻¹.

23.3. Análise microscópica

Para análise microscópica foram coletadas amostras de raízes, aos 30 dias após a inoculação (DAI). De cada tratamento foram retirados dois fragmentos de raiz com cerca de 1,0 cm, sendo um da região do ápice (coifa e região lisa ou de alongamento) e outro da região de absorção ou pelífera (onde estão os pelos absorventes). Estes fragmentos foram fixados com paraformaldeído 8,0% + 2,5% de glutaraldeído em sódio 0,05 mol/L e pampão de fosfato, pH 7,2 (GAHAN 1984 modificado), desidratados em série etanólica e emblocadas em Histoiresin® (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). Secções de 1-3µm foram obtidas com navalhas de vidro um micrótomo rotativo RM2255 (Leica) e coradas com azul de toluidina O (FEDER e O'BRIEN 1968).

As fotomicrografias foram obtidas através de um microscópio Olympus BX-41 (Olympus, Tóquio, Japão) com sistema de captura composto por câmera Imaging Source e software Image-Pro Insight.

23.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância utilizando-se o programa estatístico SISVAR e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0.10$).

24. RESULTADOS E DISCUSSÃO

24.1. Desenvolvimento da planta e atributos da raiz

A resposta ao pH dependeu da presença ou ausência do patógeno. Na solução mais ácida (4,3) e em plantas inoculadas, observou-se redução da MFF (43,44g), MSF (2,9 g), MFC (11,3g) e MSC (0,93g) em relação à solução ajustada para pH 6,3 (MFF=83,32, MSF= 6,5, MFC=18,9 e MSC= 1,56 gramas) (Tabela 14). Isso indica que o pH baixo favoreceu as perdas pela doença.

Na ausência do patógeno o pH não afetou significativamente o acúmulo de massa (fresca e seca de folha - MFF e MSF; de caule- MFC e MSC e de raiz – MFR e MSR) das plantas. Este resultado está de acordo com o padrão normalmente observado em ensaios em solução nutritiva.

Na interação entre pH e patógeno, as plantas inoculadas com *P. brassicae* tiveram o comprimento e o volume de raiz sadia reduzidos no tratamento com pH 4,3. (Tabela 15 e 16) e um correspondente efeito no desenvolvimento da parte aérea. E Gossen *et al.* (2013) já haviam relatado que com o desenvolver da doença há redução do sistema radicular efetivo da planta e, conseqüentemente, do processo de absorção de água e nutrientes levando ao aparecimento de sintomas secundários como murchas nos horários mais quentes do dia, subdesenvolvimento e redução da produção de biomassa. Por outro lado, a presença de *P.brassicae* na solução nutritiva aumentou o crescimento de raiz e a produção de massa de folhas e caules nas plantas mantidas sob pH 6,3. Essa maior produção de massa em pH 6,3, mesmo na presença do patógeno, enfatiza que o pH ácido favorece o desenvolvimento e as perdas pela doença.

A resposta das plantas quanto à produção de biomassa e comprimento da parte aérea em função do alumínio na solução nutritiva dependeu da presença ou ausência do patógeno (Tabela 14 e 15). Na ausência do patógeno, houve redução da massa fresca de folha e comprimento de parte aérea devido ao alumínio, mas não houve diferenças entre as doses 30 e 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Na dose igual 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de alumínio houve redução do comprimento da parte aérea nas plantas inoculadas comparada à não inoculadas (Tabela 15). Dos Santos *et al.* (2010) estudando rúcula (*Eruca sativa* Mill – Brassicaceae) submetidas a diferentes concentrações de alumínio em cultivo hidropônico também constatou decréscimo do comprimento total da planta. Ainda, Cruz *et al.*, (2008), relatam que o crescimento da parte aérea das plantas de sorgo representado pela altura das plantas, sofreu uma redução pela ação das doses crescentes de alumínio. Aquino *et al.* (2013) afirmam que, independentemente, da cultura os altos teores de alumínio no solo afetam o crescimento das plantas.

Na presença do patógeno, houve aumento da produção de matéria seca de raízes com o aumento da dose de Al (Tabela 14). Este acréscimo de massa seca de raízes deve-se à formação de galhas e ao acúmulo de massa nestas. A presença de *P. brassicae* na solução nutritiva aumentou o volume de raiz sadias e reduziu a percentagem de raízes com hérnia em pH 6,3. Na ausência do patógeno não houve diferenças quanto ao volume das raízes em pH 4,3 e 6,3.

O efeito do alumínio sobre o volume radicular também dependeu da presença ou ausência do patógeno. Na ausência do *P. brassicae* não houve variação significativa no volume radicular corroborando o baixo efeito do alumínio sobre o crescimento das plantas. Já na presença do patógeno, observa-se o maior volume total e maior volume de raízes com hérnia.

Nas condições deste estudo, possivelmente, existem dois fatores atuando diretamente na redução do sistema radicular e eficiência de absorção de água e nutrientes pelas plantas: o impedimento químico - pela fitotoxicidade do Al^{+3} e, o biológico pela infecção e colonização de raízes por *P. brassicae*. Porém, o impedimento biológico foi mais marcante que o químico.

Este efeito pode ser devido ao fato de que a maioria das soluções nutritivas não terem capacidade tampão. Dessa forma, o pH varia continuamente (FURLANI et al., (2009). Acredita-se que, com essa variação contínua, o pH não se manteve dentro da faixa ideal para manutenção da forma tóxica do Al^{3+} . Quando o pH do solo está abaixo de 5,0, predomina o íon Al^{3+} , em pH igual a 5,0 a metade do Al^{3+} em solução já foi hidrolisado e à medida que o pH se eleva o Al^{3+} é hidrolisado e constitui formas hidrolisadas de $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^+$ e $Al(OH)_3$ (SOUSA *et al.* 2007). Além disso, a variação do pH é proporcional a velocidade de crescimento das plantas. Logo, plantas com grande velocidade de crescimento, proporcionarão grandes alterações do pH das soluções nutritivas (MARTINEZ E CLEMENTE 2011).

Neste trabalho, supõe-se que devido ao fato de a condução do experimento ter sido feita apenas durante o segundo estágio de desenvolvimento da cultura, caracterizado pela fase de expansão das folhas externas, houve uma maior variação do pH, por ser uma fase de intenso crescimento da planta. Contudo, espera-se que a realização de um novo estudo utilizando um maior volume de solução por planta ou um sistema de fluxo contínuo que permita uma constância do valor do pH no meio nutritivo, possa revelar melhor a influência do alumínio no desenvolvimento da couve-flor e da hérnia das crucíferas. Embora não existam dados para a couve-flor, sabe-se que em canola e rúcula, que também são pertencentes à família brassicaceae, há redução no crescimento radicular na presença de alumínio na solução (CLUNE E COPELAND 1999; DOS SANTOS *et al.* 2010)

Tabela 14. Efeito de pH e de concentração de Al na solução nutritiva, da inoculação com *Plasmodiophora brassicae*, e da interação entre estes, sobre a massa de matéria fresca e seca de folhas, caules e raízes de plantas de couve-flor, cultivar ‘Verona’, avaliada aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos, em solução hidropônica.

pH solução	Massa Folha (g)				Massa de Caule (g)				Massa de Raiz (g)			
	Fresca		Seca		Fresca		Seca		Fresca		Seca	
	Testem.	<i>P. brassic.</i>	Testem	<i>P. brassic.</i>	Testem.	<i>P. brassic.</i>	Testem	<i>P. brassic.</i>	Testem	<i>P. brassic.</i>	Testem	<i>P. brassic.</i>
4,3	56,06Aa	43,44Ab	3,2 Aa	2,9Ab	12,8 Aa	11,4 Ab	0,88 Aa	0,93 Ab	8,0Aa	8,6Aa	0,46Aa	0,57Aa
6,3	55,99Ba	83,32Aa	3,7 Ba	6,5Aa	12,1 Ba	18,9 Aa	0,86 Ba	1,56 Aa	6,7 Ba	10,7Aa	0,48Ba	0,75Aa
CV(%)	34		40,2		33,3		38,69		36,9		37,93	
Concentração Al^I												
0	56,1Aa	43,4Aa	3,08a		12,10a		0,88Aa	0,93 Aa	8,0 Aa	8,6 Aa	0,46Aa	0,57Aa
30	30,1Ab	43,4Aa	2,59a		9,53a		0,60Ba	0,96 Aa	5,2 Ba	10,1 Aa	0,38Ba	0,71Aab
60	33,5Ab	45,1Aa	2,71a		9,26a		0,59Aa	0,80 Aa	5,2 Ba	11,9 Aa	0,41Ba	0,94Ab
CV(%)	34,6		41,8		37,7		41,51		38,5		39,49	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,10). (1) Experimento realizado em pH

4.3

Tabela 15. Efeito de pH e de concentração de Al na solução nutritiva, da inoculação com *Plasmodiophora brassicae*, e da interação entre estes, sobre o comprimento de raiz e de parte aérea em plantas de couve-flor, cultivar ‘Verona’, avaliada aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos, em solução hidropônica.

pH solução	Comprimento Raiz (cm)		Comprimento Parte Aérea (cm)	
	Testemunha	<i>P. brassicicae</i>	Testemunha	<i>P. brassicicae</i>
4,3	32,6 Aa	26,3Ab	40,4 Aa	36,3 Aa
6,3	31,4 Aa	38,5 Aa	37,2 Aa	43,5Aa
CV(%)	20,9		15,3	
Concentração Al^I				
0	29,5	a	40,4 Aa	36,3 Aa
30	25,7	a	31,6 Ab	34,8 Aa
60	23,8	a	28,3 Bb	36,6 Aa
CV(%)	22,5		13,1	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,10). (1) Experimento realizado em pH

4.3

Tabela 16. Efeito de pH e de concentração de Al na solução nutritiva, da inoculação com *Plasmodiophora brassicae*, e da interação entre estes sobre o volume de raízes, total, sadia e com hérnia, e porcentagem de raiz sadia e com hérnia em plantas de couve-flor, cultivar ‘Verona’, avaliada aos 35 dias após a aplicação dos tratamentos, em solução hidropônica.

pH	Volume (ml)						Porcentagem			
	Total		Sadia		Hérnia		Sadia		Hérnia	
	Testem.	<i>P. bras</i>	Testem.	<i>P. bras</i>	Testem.	<i>P. bras</i>	Testem.	<i>P. bras</i>	Testem.	<i>P. bras</i>
4,3	8,1 Aa	8,1Aa	8,2Aa	6,0Ab	0,0 Ba	2,1 Aa	100Aa	78,7Bb	0,0Ba	21,3 Aa
6,3	6,2 Aa	10,6Aa	6,2 Ba	9,9 Aa	0,0 Aa	0,7 Aa	100Aa	93,0 Aa	0,0Ba	6,9 Ab
CV(%)	38,81		34		215,38		11,48		151,16	
Concentração Al¹										
0	8,2 Aa	8,2Aa	7,11 a		0,0 Aa	2,1 Aa	100Aa	78,7 Ba	0,0 Ba	21,3 Aa
30	5,2 Ba	10,0Aa	5,56 a		0,0 Ba	4,0 Aa	100Aa	57,8Ba	0,0 Ba	36,1 Aa
60	5,2 Aa	12,2Aa	6,31 a		0,0 Ba	4,7 Aa	100Aa	63,8 Ba	0,0Ba	42,4 Aa
CV(%)	42,41		39,63		144,22		21,52		108,14	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,10). (1) Experimento realizado em pH

4.3

24.2. Concentração de alumínio e cálcio no tecido vegetal

Na ausência do patógeno, a concentração de cálcio radicular foi maior em pH 6,3 que 4,5. Já na presença do patógeno, a concentração de cálcio nas raízes não variou em função do pH da solução. Em pH mais ácido, porém, a presença do patógeno favoreceu o aumento da concentração de cálcio radicular. E, a concentração de cálcio nas raízes, variou em função do alumínio, dependendo da presença ou não do patógeno, com maior concentração de cálcio radicular na presença do patógeno.

Nos tratamentos com e sem patógeno, a presença do alumínio reduziu a concentração de cálcio radicular (Figura 23), sem diferir nas doses de 30 e 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O Ca no tecido da planta, por sua vez, tem um papel crítico na estabilidade de membranas biológicas e manutenção da integridade da célula, além de dar resistência à parede celular (MARTINEZ E CLEMENTE 2011). Sua maior ou menor concentração pode afetar os seguintes eventos: invasão dos pelos radiculares pelos zoósporos primários e secundários e a subsequente migração da *P. brassicae* através do córtex e as divisões mitóticas plasmodiais; a migração das subunidades plasmodiais e hipertrofia celular (DIXON, 2009).

Assim, acredita-se que o fato de o alumínio ter reduzido o cálcio nas raízes pode ter levado a um efeito indireto sobre as infecções e a severidade da doença devido ao aumento da permeabilidade da membrana nas células da raiz, o que facilitaria a penetração do patógeno nos pelos radiculares. Neste estudo não foi possível observar muitos danos às raízes e nem quantificar esse possível efeito indireto, provavelmente devido o pouco tempo de condução do experimento. Entretanto, há evidências diretas de que, a inibição da germinação de esporos é a causa primária da supressão da doença sob pH neutro (NIWA *et al.*, 2008) seja pelo seu efeito direto como pelo seu efeito na disponibilidade do Ca. Maiores teores de cálcio no solo afetam negativamente a germinação dos esporos germinados e a penetração do patógeno nos radiculares (DIXON, 2009).

O pH não influenciou a concentração de Al radicular, tanto na presença quanto na ausência do patógeno. Entretanto, constatou-se como tendência, um aumento na concentração de alumínio nas raízes no tratamento com maior dose de alumínio na solução nutritiva, tanto na presença quanto na ausência do patógeno (Figura 23). Este resultado pode ter sido explicado pela retenção na parede celular das células das raízes da maior parte do alumínio absorvido, cerca de 99% do total, devido às cargas negativas de grupos carboxílicos livres de pectinas (TAYLOR *et al.* 2000). O acúmulo preferencial do alumínio nas raízes leva à redução de seu crescimento e desenvolvimento, aumento de seu diâmetro e diminuição do número de raízes laterais (AQUINO *et al.* 2013). Apenas uma pequena quantidade é translocada para a parte aérea da planta (BEUTLER *et al.* 2001).

A concentração de cálcio foliar não variou com o pH tanto em presença quanto em ausência de *P. brassicae*, mas variou com as doses de Al. A resposta, porém, dependeu da presença ou ausência do patógeno. Na dose 0 de alumínio, as concentrações foliares de cálcio foram iguais em presença ou ausência do patógeno. A concentração de cálcio na folha reduziu com a presença de alumínio na solução, apesar de não variar com a dose, 30 e 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, todavia na presença do patógeno essa redução foi agravada (Figura 24). Este resultado, é o inverso do observado nas raízes, sugerindo que, por algum motivo, a colonização das raízes pelo patógeno resulta em aumento na concentração de cálcio e, conseqüentemente, redução de sua concentração na parte aérea. Salvador *et al.* (2000) constataram que doses crescentes de alumínio reduziram a absorção e o transporte de P, Ca, Mg, S, Fe e Mn para a parte aérea sugerindo que a redução de Ca e Mg deve-se a uma inibição interiônica desses cátions pelo alumínio. Freitas *et al.* (2006) concluíram que existe correlações entre teores de alumínio na

solução nutritiva e a absorção de fósforo, magnésio, cálcio e potássio e o desenvolvimento do sistema de raízes em plantas de diferentes genótipos de arroz.

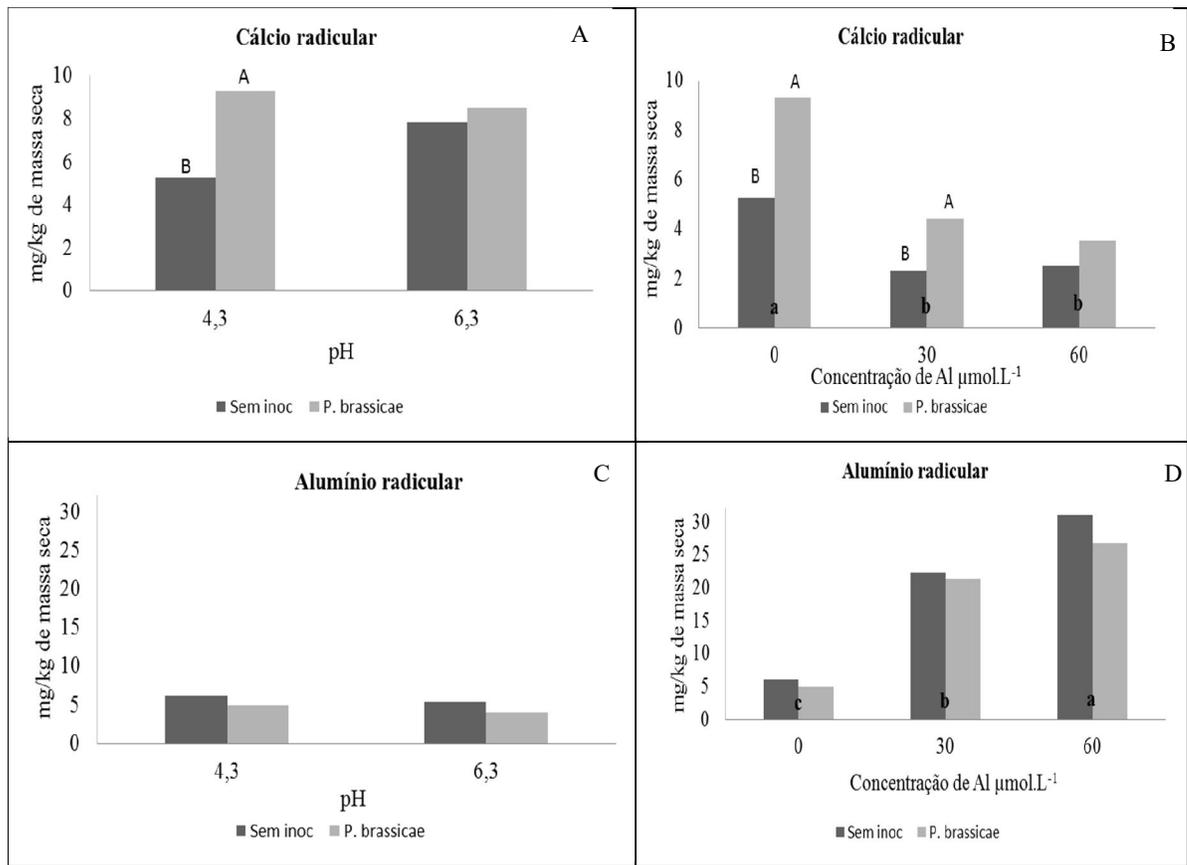


Figura 23: Concentração de Cálcio na raiz em função do pH da solução hidropônica (A); concentração de cálcio na raiz em função da concentração de Al na solução hidropônica (B); concentração de Alumínio na raiz em função do pH da solução hidropônica (C); Concentração de alumínio na raiz em função da concentração de Al na solução hidropônica (D);

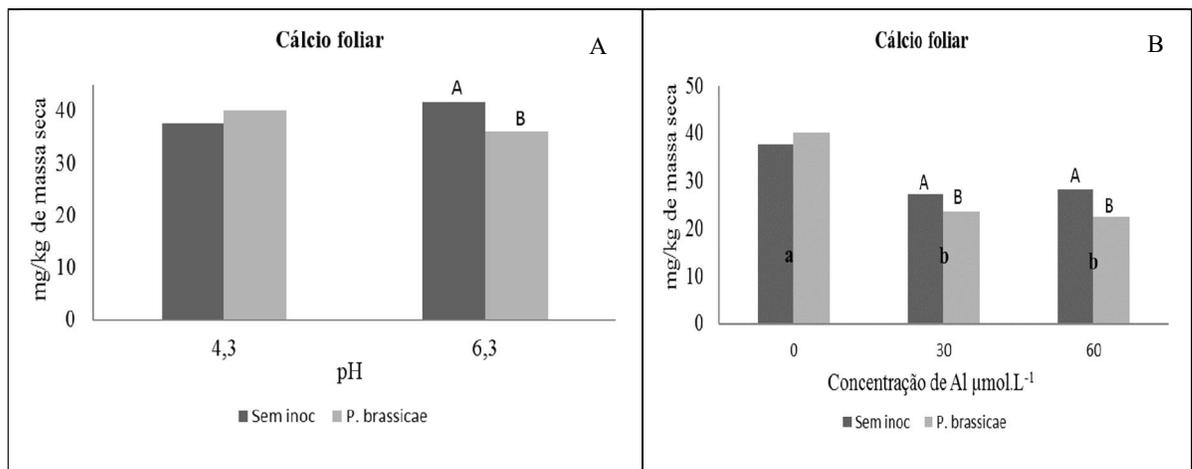


Figura 24: Concentração de Cálcio na folha em função do pH da solução hidropônica (A); Concentração de cálcio na folha em função da concentração de Al na solução hidropônica (B);

O acúmulo de cálcio e alumínio também foram analisados nas folhas e raízes. Houve uma redução do acúmulo de cálcio em tratamentos com alumínio. Plantas mantidas em solução sem alumínio tiveram o acúmulo de cálcio nas folhas cerca de 50% maior, quando comparadas às plantas mantidas em solução com 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de alumínio. As raízes apresentaram o mesmo comportamento, porém, as plantas inoculadas apresentaram maior concentração de cálcio nas raízes. Esse fato reforça a hipótese de que o alumínio reduz a absorção e o transporte de cálcio para a parte aérea e sugere que em plantas infectadas a maior presença de cálcio nas raízes se deve à redução da absorção de água e nutrientes (DIXON 2009a, KAGEYAMA E ASANO 2009, HWANG *et al.* 2011).

O acúmulo de alumínio na raiz também foi maior em plantas mantidas em soluções hidropônicas acrescidas de alumínio. Ainda, as plantas inoculadas obtiveram maiores acúmulo desse elemento nas raízes.

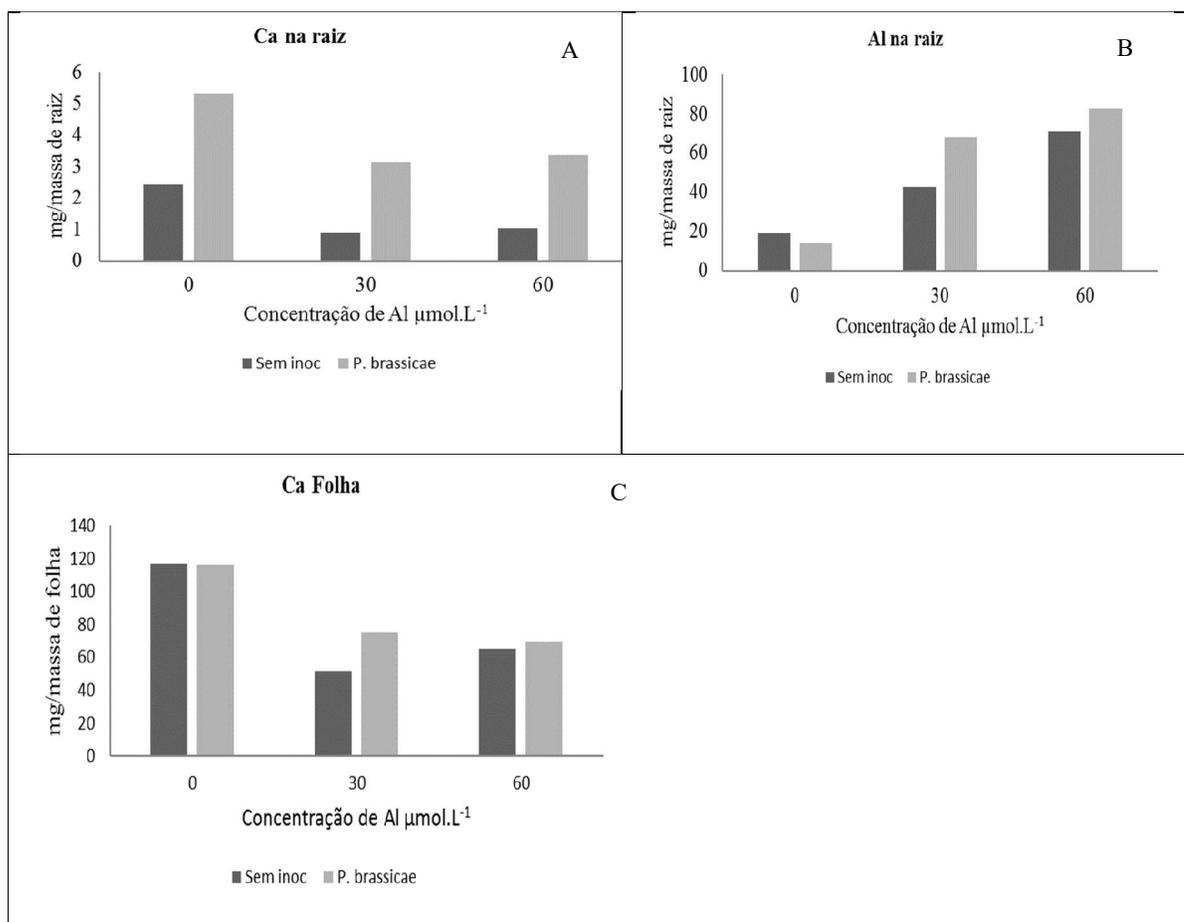


Figura 25: Cálcio acumulado na raiz em função da concentração de Al na solução hidropônica (A); alumínio acumulado na raiz em função da concentração de Al na solução hidropônica (B); Cálcio acumulado na folha em função da concentração de Al na solução hidropônica (C)

24.3. Análise microscópica

Com as análises de microscopia foi possível observar nos cortes longitudinais da região da coifa de raízes em plantas mantidas em solução nutritiva com $60 \mu\text{M.L}^{-1}$ alumínio por 30 dias, houve o excesso de núcleos, e as paredes não estão totalmente integras, algumas regiões da parede estão lisadas e as células corticais hipertrofiadas (Fig. 26 A-C).

Ainda nos cortes longitudinais da região da coifa de plantas mantidas em solução nutritiva simples com $60 \mu\text{M.L}^{-1}$ alumínio por 30 dias foi possível verificar má formação da epiderme (Fig. 27 A e B). Espaços entre as células meristemáticas indicando a má/não formação da lamela média (Fig. 27C) quando comparado com coifa íntegra, sem espaços na lamela média e sem danos a parede celular em pH 6,3 e ausência de Al (Fig. 27D); Quando se fez um o aumento na região da epiderme, pode-se verificar má formação e morte da epiderme na região de diferenciação, ocasionando aberturas e falta de proteção externa (Fig. 27E); Além disso a zona de transição apresentou degeneração da parede celular da protoderme na região meristemática o que leva à não formação da epiderme na zona de alongamento (Fig. 27F).

Esses resultados corroboram com os de Vasconcellos (2014), que observou que as células das raízes de caju de tratamentos com as maiores concentrações de Al apresentaram parede celular tortuosa ou colapsada.

No intuito de observar a interação do Al com patógeno *P. brassicae*, foram realizados cortes transversais na raiz no início da formação das galhas. Nas raízes de plântulas mantidas em solução nutritiva inoculada com *P. brassicae* por 30 dias e com alumínio ausente. Observou a ocorrência de floema e xilema secundário, porém com presença de córtex, além do início de uma periderme de origem nas camadas mais externas do córtex (Fig. 28B e C). A periderme deveria estar se originando do periciclo e não da camada externa do córtex, como observado. Esse fato se deve a possível ruptura das células do periciclo, mencionado como um efeito citológico em plantas com toxidez por alumínio (SOUSA *et al.* 2007), já que não foi possível o distinguir nas capturas de imagens, embora neste trabalho não tenha sido observada a ruptura propriamente dita.

Nas plantas inoculadas, se notou divisão celular intensa nos planos: anticlinal (seta vermelha), periclinal (seta azul) e oblíquo (seta verde) e plano de divisão assimétrico (Fig. 28C). O aumento de auxina na região colonizada pelo *P. brassicae* é citado na literatura esse, e este hormônio é responsável por aumento de divisões celulares, por estar envolvido no crescimento de plantas (LUDWIG-MULLER E SCHULLER, 2008).

Os esporos de *P. brassicae* se encontram nas células parenquimáticas do córtex e do cilindro vascular e em pelo menos duas fases de seu ciclo, sendo que um encontra-se na fase esporos de resistência e outro na fase de plasmódio secundário (Fig. 28E e F).

Ao realizar os cortes transversais nas plântulas de couve-flor (após terem sido mantidas em solução nutritiva simples com $60 \mu\text{M.L}^{-1}$ alumínio e *P. brassicae* por 30 dias, verificou um tumor vascular, sem organização anatômica de raiz (Fig. 29B e C); Além disso, as células parenquimáticas encontram-se aglomeradas, com arranjo frouxo, com presença de feixe vascular e ausência de epiderme (Fig. 29B). Essas características se assemelham a de um calo, que é basicamente um tecido tumoral, mais ou menos organizado, que geralmente surge sobre feridas de órgãos e tecidos diferenciados (SOARES *et al.*, 2002). As células com patógeno estão agrupadas e hipertrofiadas (Fig. 29D e E). A hipertrofia ocorre devido o aumento da divisão celular para a formação das galhas ou hérnia, e os tecidos da periferia estão desorganizados e frouxos (Fig. 29F).

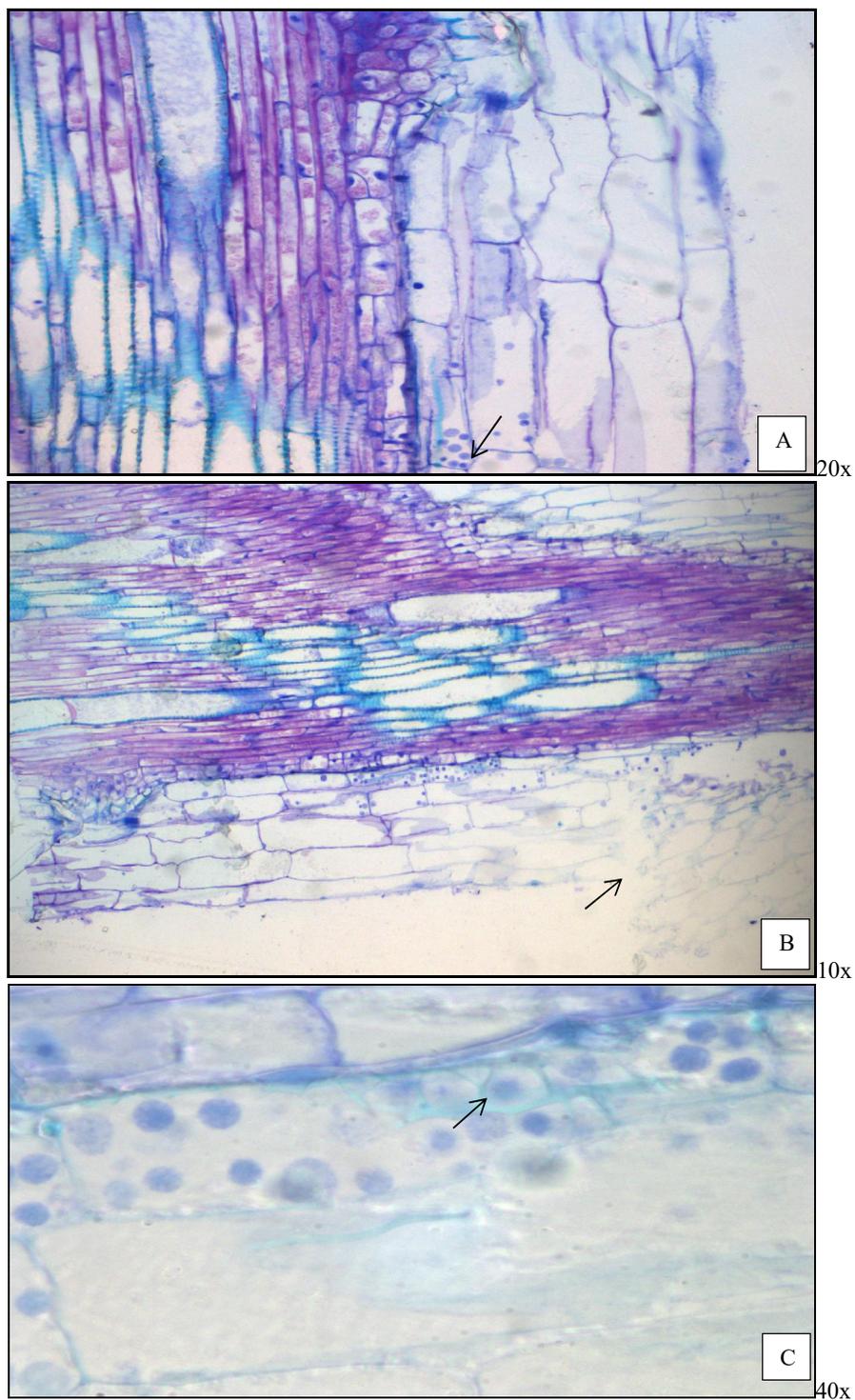


Figura 26. Microfotografias de cortes longitudinais da região da coifa de raízes de plântulas de couve-flor (*Brassicae oleraceae* var. *botrytis*) corados com azul de toluidina após terem sido mantidas em solução nutritiva com 60 $\mu\text{M.L}^{-1}$ alumínio por 30 dias. Detalhe mostrando excesso de núcleos (A; B; e C), paredes lisadas e células corticais hipertrofiadas (B); núcleo extranumerário (C).

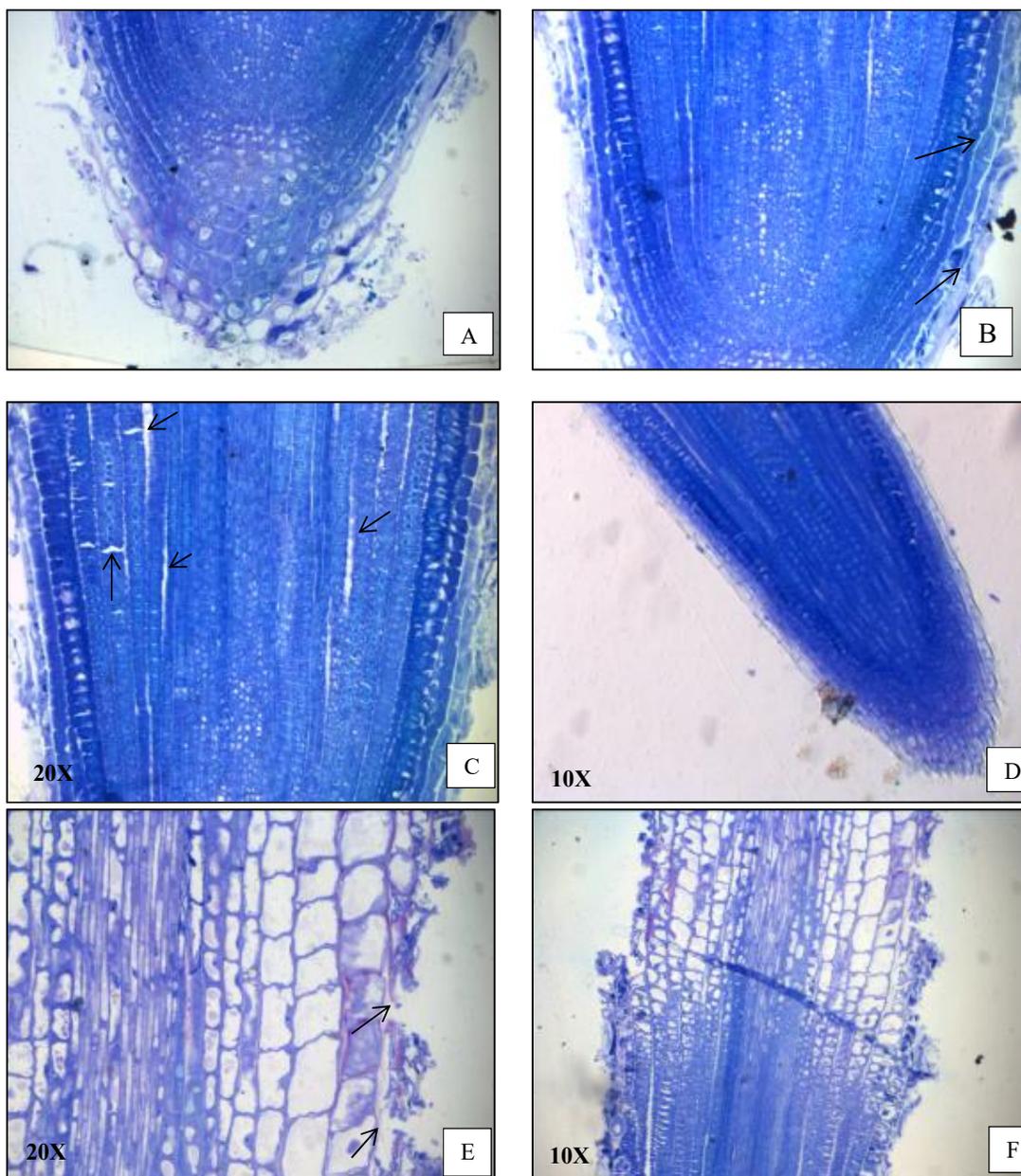


Figura 27. Microfotografias de cortes longitudinais da região da coifa de raízes de plântulas de couve-flor (*Brassicae oleraceae* var. *botrytis*) corados com azul de toluidina após terem sido mantidas em solução nutritiva com $60 \mu\text{M.L}^{-1}$ de alumínio por 30 dias. Observa-se má formação da epiderme (A e B); espaços entre as células meristemáticas indicando a má/não formação da lamela média (C); coifa íntegra, sem espaços na lamela média e sem danos a parede celular em pH 6,3 e ausência de Al (D); Má formação da epiderme e morte da mesma na região de diferenciação, ocasionando aberturas e falta de proteção externa (E); Zona de transição mostrando a degeneração da parede celular da protoderme na região meristemática levando à não formação da epiderme na zona de alongamento(F).

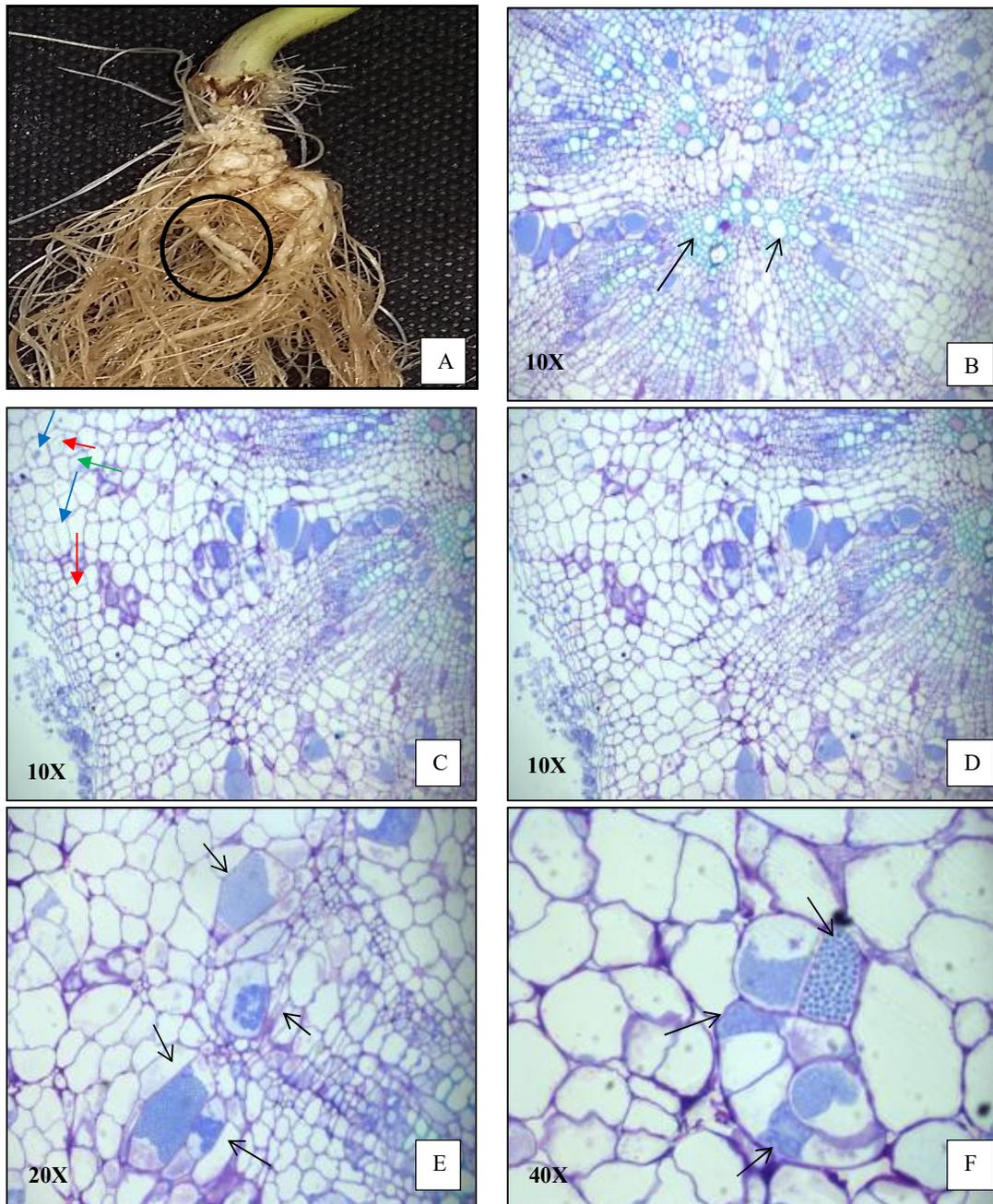


Figura 28. Microfotografias de cortes transversais da região de absorção de raízes de plântulas de couve-flor (*Brassicae oleraceae* var. *botrytis*) corados com azul de toluidina após terem sido mantidas em solução nutritiva e inoculadas com *Plasmodiophora brassicae* por 30 dias. Observa-se ocorrência de floema e xilema secundário, porém, com presença de córtex além do início de uma periderme de origem nas camadas mais externas do córtex (B e C). Divisão celular intensa nos planos: anticlinal (seta vermelha), periclinal (seta azul) e oblíquo (seta verde; e plano de divisão assimétrico (C). Esporos de *P. brassicae* nas células parênquimáticas do

córtex e do cilindro vascular e em pelo menos duas fases de seu ciclo e esporos de resistência no plasmódio secundário (E e F).

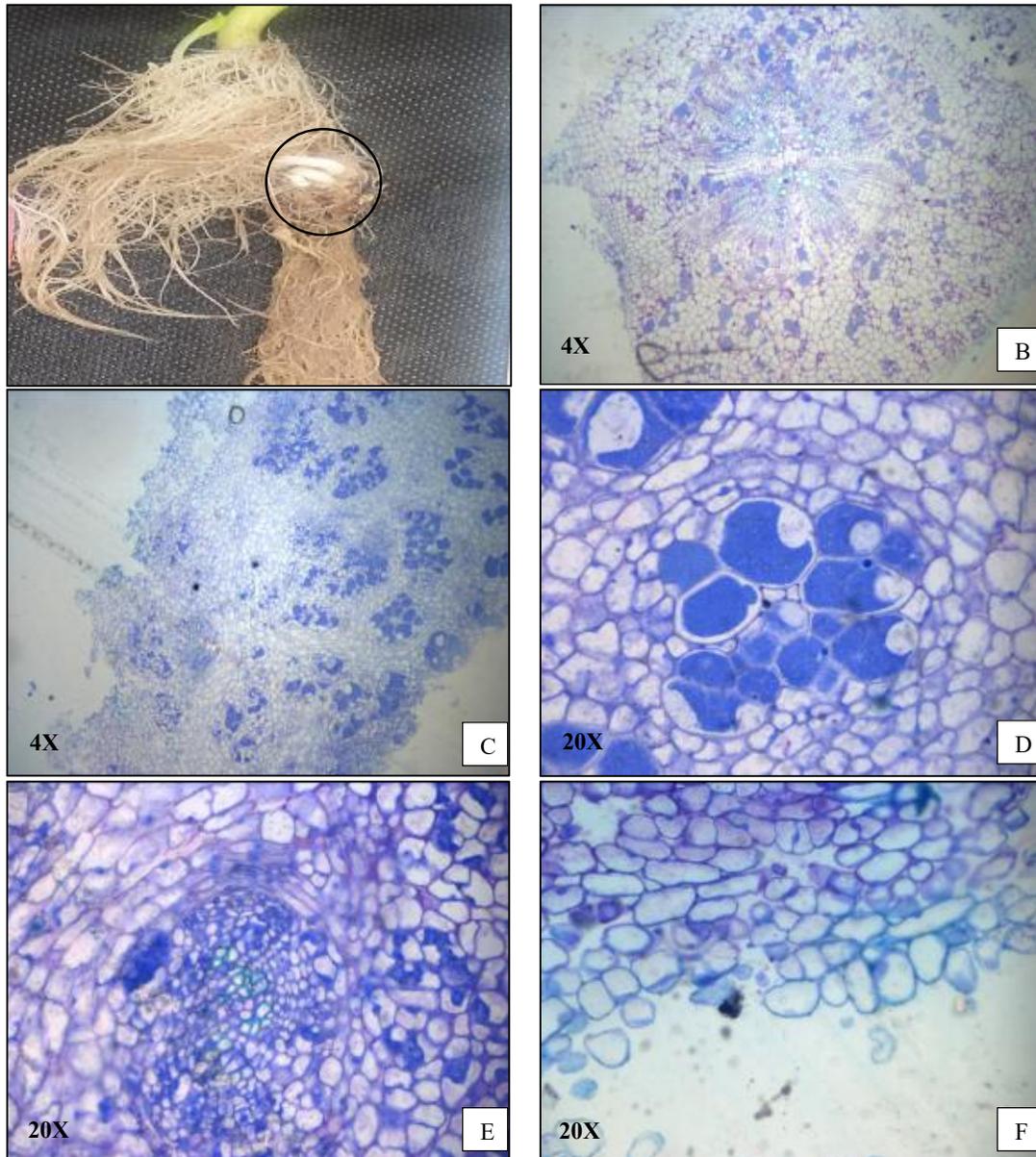


Figura 29. Micrografias óticas de cortes transversais da região de absorção de raízes de plântulas de couve-flor (*Brassicae oleraceae* var. *botrytis*) corados com azul de toluidina após terem sido mantidas em solução nutritiva, com $60 \mu\text{M.L}^{-1}$ alumínio e inoculada com *Plasmodiophora brassicae*, por 30 dias. Visão geral do tumor vascular, sem organização anatômica de raiz (B e C); células parenquimáticas aglomeradas, de arranjo frouxo, com presença de feixe vascular e ausência de epiderme, semelhante a um calo (B); Células com patógeno agrupadas e hipertrofiadas (D e E); tecido desorganizado e mais frouxo na periferia (F).

Os resultados da microscopia sugerem que o alumínio causa danos às raízes que podem facilitar a entrada do patógeno e /ou aumentar a severidade da doença, embora estes efeitos não tenham sido constatados neste trabalho, através das análises de desenvolvimento da planta e atributos de raízes. Suspeita-se que o pouco tempo, 35 dias, de cultivo das plantas em solução contendo alumínio e patógeno, não tenha sido suficiente para observar e quantificar danos mais visíveis.

Agrios (2005) e Kageyama e Asano (2009) relataram que na fase de infecção do pelo radicular e do córtex, que geralmente vai até o 14º dia após a inoculação, não havia sintomas visíveis e que a formação das galhas características se forma por volta de 30 dias após a inoculação. Kageyama e Asano (2009) também observaram que a germinação dos esporos é iniciada apenas 2 dias após o início da inoculação, e aumenta durante 6 dias, e que a germinação de esporos de repouso maduros pode ser afetada por fatores ambientais como pH, umidade, temperatura, íons inorgânicos e fatores biológicos (FRIBERG *et al.* 2005).

Diante do exposto nota-se que a infecção do pelo radicular pode ter ocorrido dias após a inoculação (DAI) e que apenas 35 dias não foram suficientes para causara significativos no desenvolvimento da planta. Além disso, as plantas de couve-flor não chegaram ao estágio de diferenciação floral e desenvolvimento da inflorescência, que são estádios mais propícios para quantificação de perdas.

25. CONCLUSÕES

1. A resposta ao pH dependeu da presença ou ausência do patógeno, sendo que o pH baixo favoreceu as perdas pela doença.
2. O alumínio reduziu o comprimento de parte aérea, a concentração e acúmulo de cálcio nas folhas e raízes;
3. O alumínio ocasionou má formação da lamela média e danos na parede celular de células das raízes;
4. O patógeno reduziu o comprimento de raiz e o volume de raiz sadia e aumentou a concentração de cálcio e as divisões celulares nas raízes.
5. A interação alumínio x patógeno, afetou o crescimento e a morfologia radicular das plantas.

26. REFERENCIAS

- AQUINO, E. L., SANTOS, A. D. S., SOUZA, G. D., & SILVA, P. C. C. Plantas de amendoim (*Arachis hypogaeae* L.) submetidas à diferentes doses de alumínio em solução nutritiva. **Enciclopédia Biosfera**, 9(16), 1698-1714. 2013.
- CAIRES, E. F. Correção da acidez do solo em sistemas plantio direto. Piracicaba-SP: **International Plant Nutrition Institute** (INPI), 13 p. (Informações agronômicas, n.141). 2013.
- CLUNE, T. S and COPELAND L. Effects of aluminium on canola roots. **Plant and Soil**. 216: 27–33. 1999.
- CRUZ, F. J. R.; COSTA, R. C. da.; BARRETO, A. G. T.; NETO, C. F. de O.; CAMARGO, P. M. P.; MECANISMOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA TOXIDAZ DE ALUMÍNIO (Al³⁺) EM PLANTAS SORGO [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. In: VI Seminário de Iniciação Científica/UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA/Amazônia Oriental Anais. 2008.
- DIXON GR. *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 28, n. 3, p. 212-228, 2009a.
- DIXON, G.R. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. **Journal Plant of Growth Regulation**, 28:194–202, 2009b.
- DIXON, G.R. The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor. a review of recent advances. **Acta-Horticulturae**, v. 706, p. 271-282, 2006.
- DONALD, C. & PORTER, I. Integrated control of clubroot. **Journal Plant of Growth Regulation**, 28:289–303. 2009
- DOS SANTOS, C. A. C., DE ALMEIDA, J., DOS SANTOS, A. R., VIEIRA, E. L., & PEIXOTO, C. P. Rúcula em cultivo hidropônico submetida em diferentes concentrações de alumínio= Eruca in hydroponics posted in different concentrations of aluminum. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 6, 2010.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v.5, n.1, p.123-142, 1968.
- FREITAS, F. A.; KOPP, M. M.; SOUSA, R. O.; ZIMMER, P. D.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.72- 79, 2006.
- FURLANI, P. R.; SILVEIRA, L. C. P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIN, V. **Cultivo Hidropônico de Plantas: Parte 2 - Solução Nutritiva**. 2009.
- GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and citochemistry**. Academic Press. 1984.

GOSSEN B.D., DEORA A., PENG G., HWANG S. E MCDONALD M.R. Effect of environmental parameters on clubroot development and the risk of pathogen spread. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 36:sup1, 37-48. 2014.

GOSSEN BD, MCDONALD MR, HWANG SF, STRELKOV SE, PENG, G. Comparison of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) development and management on canola and Brassica vegetables. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 35:175–191. 2013.

GUERRA, J. G. M., LEAL, M. A. de A., FERREIRA, M. B. C. **Recomendações de adubos e corretivos e de manejo da matéria orgânica para as principais culturas de Estado do Rio de Janeiro.** p. 303-304 em: Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro. Editora Universidade Rural, Seropédica. 2013.

GUPTA, N.; GAURAV, S.S.; KUMAR, A. Molecular Basis of Aluminium Toxicity in Plants: A Review. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, p-21-37, 2013.

HWANG, S. F. et al. Influence of cultivar resistance and inoculum density on root hair infection of canola (*Brassica napus*) by *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, v. 60, n. 5, p. 820-829, 2011a.

HWANG, S. F. et al. Seedling age and inoculum density affect clubroot severity and seed yield in canola. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 183-190, 2011b.

KAGEYAMA, K.; ASANO, T. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 3, p. 203-211, 2009.

MAY, A., TIVELLI, S. W., VARGAS, P. F.; SAMRA, A.G.; SACCONI, L.V.; PINHEIRO, M. Q.; A cultura da couve-flor: Instituto agrônômico (IAC), **Boletim Técnico IAC**, n. 200, p. 36, 2007.

MARTINEZ, H.E.P.; CLEMENTE, J.M. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa.** 1ª ed. Viçosa, Editora UFV. p. 76, 2011.

NIWA, R.; NOMURA, Y.; OSAKI, M; EZAWA, T. Suppression of clubroot disease under neutral pH caused by inhibition of spore germination of *Plasmodiophora brassicae* in the rhizosphere. **Plant Pathology**, v. 57, 445–452, 2008.

RASTAS, MARIKA, SATU LATVALA, AND ASKO HANNUKKALA. "Occurrence of *Plasmodiophora brassicae* in Finnish turnip rape and oilseed rape fields." **Agricultural and Food Science** 21.2: 141-158. 2012.

SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E.; CABRAL, C. P. Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.24, p.787-796, 2000.

SHARMA K, GOSSEN BD, MCDONALD MR. Effect of temperature on primary infection by *Plasmodiophora brassicae* and initiation of clubroot symptoms. **Plant Pathology**. 60:830–838. 2011a.

SHARMA K, GOSSEN BD, MCDONALD MR. Effect of temperature on cortical infection by *Plasmodiophora brassicae* and clubroot severity. **Phytopathology**. 101:1424–1432. 2011b.

SOARES, G. A.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R.C.; SANTOS, C. G.; SANTANA, J. R. F.; PAIVA, P.D.O. Indução de calos em explantes foliares e segmentos internodais de *Inga affinis* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D. In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2002, Belém. Anais do SOUSA, D.M.G. de; e OLIVEIRA, S. A. **Acidez do solo e sua correção**. p. 205- 274 em: Fertilidade do Solo. SBCS, Viçosa. 2007.

TAYLOR, G. J.; MCDONALD-STEPHENS, J. L.; HUNTER, D. B.; BERTSCH, P. M.; ELMORE, D.; RENGEL, Z.; REID, R. J.: Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. **Plant Physiology**, Stanford, v. 123, p. 987-996, 2000.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. . **Method 3051 A Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils**. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2007. EPA SW 846 3051a. 30p, 2007. Disponível em:<<http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf> Acesso em: 09/03/2017.

27. CONCLUSÕES GERAIS

Existe uma relação direta entre os atributos do solo, em particular acidez e teor de alumínio trocável, com a hérnia e com acúmulo de biomassa e de macronutrientes nos diferentes órgãos das plantas de couve-flor.

A maioria dos produtores não adotam práticas simples e básicas para o controle da doença como rotação de culturas e correção da acidez do solo nem adotam medidas preventivas visando limitar a dispersão do inóculo do patógeno. O quadro atual indica condição altamente favorável à ocorrência da doença em média a alta severidade em todas as propriedades investigadas.

Existe uma relação indireta entre a diversidade e intensidade da hérnia das crucíferas, devido ao efeito da matéria orgânica na acidificação do solo.

A correção da acidez do solo favoreceu o desenvolvimento das raízes, expresso pelo maior volume total de raízes, mas não reduziu a porcentagem de raízes com galhas. As melhores condições químicas do solo e maior desenvolvimento radicular com aumento das doses de corretivo favoreceram o incremento de massa fresca das plantas e das inflorescências.

O alumínio reduziu o comprimento de parte aérea, a concentração e acúmulo de cálcio nas folhas e raízes e ocasionou má formação da lamela média e danos na parede celular. O patógeno *P. brassicae* em solução hidropônica reduziu o comprimento de raiz e o volume de raiz sadia e aumentou a concentração de cálcio e as divisões celulares nas raízes.

ANEXO A

Questionário

Código da Amostra: _____

Identificação

Município:		Data	
Proprietário:		Local	
Tamanho da Propriedade:		Assistência Técnica	
Amostras			
1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12

Caracterização da propriedade

Há quanto tempo cultiva brássicas:
Data último plantio de Couve flor neste talhão
Quantos ciclos:
Porque interrompeu:
Fez pousio:
Caso não tenha plantado brássica quais foram as culturas anteriores neste talhão

Preparo do solo

<i>Implementos usados</i> () arado () grade () enxada rotativa () encanteirador ()	() pessoal () comunitário () faz limpeza prévia () não faz limpeza prévia
Prática de conservação de solo	() plantio direto () sem canteiros () plantio em nível () canteiros morro abaixo () terraços () canteiros em nível () cultivo de faixa de retenção () canteiros diagonal ()
<i>Forma de preparo do solo</i>	
Aterro () sim () não	Quando:

Fertilidade do solo

Análise de solo () sim () não	Quando:
Calagem () sim () não	Quando: Quando: Tipo de Calcário:

Cultivo da Couve-Flor

Cultivar:
Mudas () preparo na propriedade ou () viveirista () bandeja de isopor ou () bandeja de plástico ou () copinho () () substrato comercial ou () substrato de preparo local () transplante imediato ou () deposição na área até transplante Água usada para irrigar as mudas:

ANEXO B

Quadro 2. Descrição dos *primers* e tamanho dos fragmentos gerados na amplificação do da região 16S do rDNA de bactérias.

Nome	Sequencia 5'3'	Região do DNA	Tamanho do fragmento
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rDNA de bactérias	1500 pb
1512r	ACGGCTACCTTGTTACGACT		
GC-338f	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCA GCAG	Região V3 do 16S rDNA de bactérias	198 pb
518r	ATTACCGCGGCTGCTGG		

ANEXO C

Quadro 3. Resumo da análise de variância dos atributos do solo do solo aos 70 dias após a correção, antes do transplântio.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio											
		Ca	Mg ^t	H+Al	Al ^t	SB	CTC	V%	mt	pH	Corgânico	P	K
		cmol _c .dm ³						%	(1:2,5)		%	mg.L ⁻¹	
Doses de calcário	3	38,11*	0,080*	64,08*	0,035*	78,32*	2,38 ^{ns}	2035,58*	3,63*	3,38*	0,101 ^{ns}	4361,15*	99944,98*
Bloco	3	3,07 ^{ns}	0,042 ^{ns}	0,90 ^{ns}	0,007 ^{ns}	15,37*	17,47 ^{ns}	113,32 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,100 ^{ns}	0,049 ^{ns}	13816,49*	119580,43*
Resíduo	25	1,55	0,027	2,93	0,004	3,41	3,46	64,99	0,351	0,07	0,253	897,66	14723,88
CV(%)		20,01	13,62	18,71	9,26	19,95	10,1	16,16	56,75	4,41	27,74	23,83	22,83

*F significativo a 5%; ^{NS} não significativo

t- transformado \sqrt{x}

ANEXO D

Quadro 4. Resumo da análise de variância das características de severidade, massa fresca de raiz (MFR), massa fresca de hérnia (MFH), volume de raízes total (VOLT), volume de raízes com hérnia (VOLH), volume de raízes sadia(VOLS); percentagem de raiz sadia (PRS) e percentagem da raiz com hérnia (PRH).

Fonte de variação	GL	Quadrado médio							
		Severidade	MFR-total ^t	MFH ¹	VolT ¹	VolH ¹	VolS ^t	PRH ¹	PRS
Cultivar	1	0,0166 ^{ns}	315,50*	0,0414 ^{ns}	151,77*	0,720 ^{ns}	156,59*	3,84 ^{ns}	483,43 ^{ns}
Dose	3	0,110 ^{ns}	27,19*	3,098 ^{ns}	11,23*	3,880 ^{ns}	16,79*	3,56 ^{ns}	475,96 ^{ns}
Cultivar x Dose	3	0,025 ^{ns}	21,77*	2,904 ^{ns}	6,55 ^{ns}	0,952 ^{ns}	4,94 ^{ns}	1,17 ^{ns}	107,61 ^{ns}
Residuo	312	0,097	3,45	2,17	2,63	2,42	3,15	3,85	278,1
CV(%)		25,96	21,48	84,53	19,99	82,56	22,85	91,13	18,02

*F significativo a 5%; ^{ns} não significativo

^t- transformado \sqrt{x}

¹- transformado $\sqrt{x + 1}$

ANEXO E

Quadro 5. Resumo da análise de variância das características de massa de matéria fresca de folha (MFF), de massa de matéria fresca de caule (MFC), de massa de matéria fresca de inflorescência (MFI), de massa de matéria fresca de parte aérea (MFPA), de massa de matéria fresca total (MFT), diâmetro da inflorescência e classe.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio					
		MFF ^t	MFC ^t	MFI ^t	MFPA ^t	MFT	Diâmetro
Cultivar	1	3637,84*	1650,86*	113,92*	4155,75*	4441,09*	86,154 ^{ns}
Dose	3	68,99 ^{ns}	17,90*	137,29*	150,28*	169,23*	74,16*
Cultivar x Dose	3	114,43 ^{ns}	17,37*	42,20 ^{ns}	120,22 ^{ns}	133,63 ^{ns}	42,66 ^{ns}
Resíduo	312	49,85	5,96	22,26	56,73	57,02	24,18
CV(%)		22,43	17,14	21,87	18,31	17,95	24,89

*F significativo a 5%; ^{ns} não significativo

t- transformado \sqrt{x}

ANEXO F

Quadro 6. Resumo da análise de variância das características de plantas mortas, plantas subdesenvolvidas, plantas normais e produtividade por parcela.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		Mortas ¹	Subdesenvolvida ¹	Normais	Produtividade/parcela ¹
Cultivar	1	0,0042 ^{ns}	1,494 ^{ns}	211,66 ^{ns}	5564,90*
Doses	3	0,126 ^{ns}	3,329 ^{ns}	275,99*	2521,82*
Cultivar x Doses	3	0,288 ^{ns}	0,132 ^{ns}	49,57 ^{ns}	1260,37 ^{ns}
Bloco	3	0,102 ^{ns}	4,323 ^{ns}	220,34*	625,61 ^{ns}
Resíduos	21	0,102	1,401	69,28	868,57
CV(%)		24,56	28,43	28,71	26,4

*F significativo a 5%; ^{NS} não significativo

1- transformado $\sqrt{x + 1}$

ANEXO G

Quadro 7. Resumo da análise de variância das características de concentração de nitrogênio na inflorescência (NCI), concentração nitrogênio na parte aérea (NPA), concentração potássio na inflorescência (KCI), concentração potássio na parte aérea (KPA), concentração cálcio na inflorescência (CaI), concentração cálcio na parte aérea (CaPA), concentração magnésio na inflorescência (MgI) e concentração Magnésio na parte aérea (MgPA). Dados transformados por Raiz quadrada de X.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio							
		NI ^t	NPA ^t	KI ^t	KPA ^t	CaI ^t	CaPA ^t	MgI ^t	MgPA ^t
Cultivar	1	0,58 ^{NS}	0,53 ^{NS}	0,2 ^{NS}	0,06 ^{NS}	769,27 ^{NS}	1237,23 ^{NS}	51,05 ^{NS}	5,7 ^{NS}
Dose	3	1,53 ^{NS}	0,9 ^{NS}	0,02 ^{NS}	0,09 ^{NS}	197,11 ^{NS}	45,05 ^{NS}	30,5 ^{NS}	32,16 ^{NS}
Cultivar*dose	3	1,18 ^{NS}	1,03 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,13 ^{NS}	270,44 ^{NS}	143,44 ^{NS}	11,06 ^{NS}	9,73 ^{NS}
Bloco	3	1,4 ^{NS}	0,67 ^{NS}	0,05 ^{NS}	0,17 ^{NS}	996,32*	7292,69*	70,11 ^{NS}	43,79 ^{NS}
Erro	21	0,69	0,42	0,09	0,22	322,79	400,95	33,02	19,41
CV%		11,2	5,8	16,51	14,83	31,54	15,54	16,23	6,56

*F significativo a 5%; ^{NS} não significativo

t- transformado \sqrt{x}

ANEXO H

Quadro 8. Resumo da análise de variância das características de concentração cobre na inflorescência (CuI), concentração cobre na parte aérea (CuPA), concentração zinco na inflorescência (ZnI), concentração zinco na parte aérea (ZnPA), concentração ferro na inflorescência (FeI), concentração ferro na parte aérea (FePA), concentração manganês na inflorescência (MnI) e concentração manganês na parte aérea (MnPA). Dados transformados por Raiz quadrada de X.

		Quadrado médio							
Fonte de variação	GL	CuI ^t	CuPA ^t	ZnI ^t	ZnPA ^t	FeI ^t	FePA ^t	MnI ^t	MnPA ^t
Cultivar	1	0,04 ^{NS}	0,22 ^{NS}	0,69 ^{NS}	0,23 ^{NS}	20,10 ^{NS}	22,40 ^{NS}	0,51 ^{NS}	4,60E-04 ^{NS}
Dose	3	0,02 ^{NS}	0,16 ^{NS}	0,96 ^{NS}	2,43 ^{NS}	3,28 ^{NS}	17,62 ^{NS}	0,13 ^{NS}	0,85 ^{NS}
Cultivar*dose	3	0,05*	0,46	0,27 ^{NS}	0,07 ^{NS}	2,54 ^{NS}	72,88 ^{NS}	0,18 ^{NS}	1,53 ^{NS}
Bloco	3	0,13**	13,39**	0,65 ^{NS}	4,10 ^{NS}	24,09*	2767,39**	1,31*	23,37**
Erro	21	0,02	1,02	1,17	1,93	5,78	189,05	0,41	0,81
CV%		13,15	25,89	15,99	11,14	23,80	30,82	13,26	9,64

**F significativo a 1%; *F significativo a 5%; ^{NS} não significativo

t- transformado \sqrt{x}

ANEXO I

Quadro 9. Resumo da análise de variância das características de Nitrogênio acumulado na inflorescência (N_{AcumI}), Nitrogênio na parte aérea (N_{AcumPA}), potássio acumulado na inflorescência (K_{AcumI}), potássio acumulado na parte aérea (K_{AcumPA}), Cálcio acumulado na inflorescência (Ca_{AcumI}), Cálcio acumulado na parte aérea (Ca_{AcumPA}), Magnésio acumulado na inflorescência (Mg_{AcumI}) e Magnésio acumulado na parte aérea (Mg_{AcumPA}).

Quadrado médio									
Fonte de variação	GL	N _{AcumI} ^t	N _{AcumPA} ^t	K _{AcumI} ^t	K _{AcumPA} ^t	Ca _{AcumI} ^t	Ca _{AcumPA} ^t	Mg _{AcumI} ^t	Mg _{AcumPA} ^t
Cultivar	1	4,46**	0,0072 ^{NS}	0,0002 ^{NS}	0,55**	2,17***	64,43 ^{NS}	0,26 ^{NS}	135,43**
Dose	3	0,34 ^{NS}	0,0068 ^{NS}	0,0001 ^{NS}	0,015 ^{NS}	0,69 ^{NS}	38,71 ^{NS}	0,14 ^{NS}	15,67 ^{NS}
Cultivar*dose	3	0,66 ^{NS}	0,0051 ^{NS}	0,0002 ^{NS}	0,03 ^{NS}	0,43 ^{NS}	44,72 ^{NS}	0,01 ^{NS}	6,83 ^{NS}
Bloco	3	0,78*	0,0054 ^{NS}	0,0005 ^{NS}	0,15 ^{NS}	2,65*	1300,23*	0,35*	27,37**
Erro	21	0,23	0,0041	0,0002	0,06	0,64	90,97	0,07	5,19
CV%		7,79	19,89	16,94	2,45	32,34	15,3	17,65	6,96

**F significativo a 1%; *F significativo a 5%; ^{NS} não significativo

t- transformado \sqrt{x}

ANEXO J

Quadro 10. Resumo da análise de variância das características de cobre acumulado na inflorescência (CuAcumI), cobre acumulado na parte aérea (CuAcumPA), zinco acumulado na inflorescência (ZnAcumI), Zinco acumulado na parte aérea (ZnAcumPA), Ferro acumulado na inflorescência (FeAcumI), Ferro acumulado na parte aérea (FeAcumPA), Manganês acumulado na inflorescência (MnAcumI) e Manganês acumulado na parte aérea (MnAcumPA).

Quadrado médio									
Fonte de variação	GL	CuAcumPA^t	CuAcumI^t	ZnAcumPA^t	ZnAcumI^t	FeAcumPA^t	FeAcumI^t	MnAcumI^t	MnAcumPA^t
Cultivar	1	0,24 ^{NS}	1,30E-05 ^{NS}	6,77**	0,0059 ^{NS}	34,07 ^{NS}	0,06*	0,0034 ^{NS}	3,07**
Dose	3	0,01 ^{NS}	1,10E-05 ^{NS}	0,8 ^{NS}	0,004 ^{NS}	2,86 ^{NS}	0,013	0,0009 ^{NS}	0,07 ^{NS}
Cultivar*dose	3	0,09 ^{NS}	9,00E-05 ^{NS}	0,07 ^{NS}	0,0001 ^{NS}	22,88 ^{NS}	0,006	0,000064 ^{NS}	0,45 ^{NS}
Bloco	3	3,84**	2,30E-04 ^{NS}	2,55**	0,0056 ^{NS}	799,73**	0,072**	0,004118*	7,50**
Erro	21	0,24	6,00E-05	0,45	0,003	42,02	0,01	0,0011	0,15
CV%		25,43	18,56	10,99	18,65	29,49	23,41	15,87	8,65

**F significativo a 1%; *F significativo a 5%; ^{NS} não significativo

^t - transformado \sqrt{x}

ANEXO K

Quadro 11. Resumo da análise de variância referente aos dados de comprimento de parte aérea (PA) e de raiz, e de massa fresca e seca de folha, raiz e caule de couve-flor em função do pH da solução nutritiva, da presença ou não do patógeno na solução nutritiva e da interação entre estes, e em função da concentração de Al, presença ou não do patógeno na solução nutritiva, e da interação entre estes em ensaio em sistema hidropônico.

Fonte	G	Comprimento		Massa Folha		Massa Caule		Massa Raiz	
		L	PA	Raiz	Fresca	Seca	Fresca	Seca	Fresca
pH solução	1	23,6 ^{NS}	180,4 ^{***}	2378,0 ^{**}	24,7 ^{***}	69,7 [*]	0,56 [*]	1,1 ^{NS}	0,06 ^{NS}
Inocul. Pb	1	7,4 ^{NS}	1,0 ^{NS}	324,4 ^{NS}	10,2 [*]	43,3 ^{NS}	0,85 ^{**}	31,7 [*]	0,22 ^{**}
pH x Pb	1	161,2 ^{**}	268,0 ^{***}	2393,6 ^{**}	13,4 ^{**}	104,5 ^{**}	0,64 [*]	18,3	0,04 ^{NS}
Erro	20	36,3 ^{NS}	45,4	412,8	2,7	21,1	0,17	9,8	0,05
CV		15,3	20,9	34,0	40,2	33,3	38,69	36,9	37,93
Conc. Al	2	156,3 ^{***}	99,8 [*]	572,3 [*]	0,7 ^{NS}	29,5 ^{NS}	0,13 ^{NS}	2,45 ^{NS}	0,09 ^{NS}
Inocul. Pb	1	30,2 ^{NS}	27,7 ^{NS}	151,2 ^{NS}	3,3 ^{NS}	28,6 ^{NS}	0,39 [*]	144,2 ^{***}	0,94 ^{***}
Al x Pb	2	85,8 ^{**}	78,4 ^{NS}	631,0 [*]	1,5 ^{NS}	25,2 ^{NS}	0,07 ^{NS}	29,1 [*]	0,13 ^{NS}
Erro	18	20,3	35,3	210,4	1,3	15,0	0,11	9,9	0,05
CV		13,1	22,5	34,6	41,8	37,7	41,51	38,5	39,49

***F significativo a 1%; **F significativo a 5%; *F significativo a 10% ; ^{NS} não significativo

ANEXO L

Quadro 12. Resumo da análise de variância referente aos dados de volume de raiz, total, sadia e com hérnia, e de percentagem de raiz sadia e com hérnia em plantas de couve-flor em função do pH da solução nutritiva, da presença ou não do patógeno na solução nutritiva e da interação entre estes, e em função da concentração de Al, presença ou não do patógeno na solução nutritiva, e da interação entre estes em ensaio em sistema hidropônico.

Fonte	GL	Volume de Raiz			Porcentagem de Raiz	
		Total	Sadia	Hérnia	Sadia	Hérnia
pH solução	1	0,45 ^{NS}	5,61 ^{NS}	2,87 ^{NS}	309,31 ^{NS}	309,31 ^{NS}
Inocul. Pb	1	29,35 ^{NS}	3,56 ^{NS}	12,47 ^{***}	1195,68 ^{***}	1195,7 ^{***}
pH x Pb	1	29,7 ^{NS}	51,04 ^{***}	2,87 ^{NS}	309,31 ^{NS}	309,31 ^{NS}
Erro	20	10,4	6,65	2,41	113,83	113,83
CV		38,81	34	215,38	11,48	151,16
Conc. Al	2	3,31 ^{NS}	6,91 ^{NS}	5,33 ^{NS}	345,46 ^{NS}	345,46 ^{NS}
Inocul. Pb	1	139,43 ^{***}	0,87 ^{NS}	118,23 ^{***}	9914,52 ^{***}	9914,52 ^{***}
Al x Pb	2	38,66 [*]	15,33 ^{NS}	5,33 ^{NS}	345,46 ^{NS}	345,46 ^{NS}
Erro	18	11,94	6,3	6,83	322,08	322,08
CV		42,41	39,63	144,22	21,52	108,14

***F significativo a 1%; **F significativo a 5%; *F significativo a 10% ; ^{NS} não significativo

ANEXO M

Resumo da análise de variância referente aos dados de concentração de alumínio e cálcio nas raízes e folhas de couve-flor em função do pH da solução nutritiva, da presença ou não do patógeno na solução nutritiva, e da interação entre estes, e em função da concentração de Al, presença ou não do patógeno na solução nutritiva, e da interação entre estes em ensaio em sistema hidropônico.

Fonte de variação	GL	Raiz		Folha	
		Al	Ca	Al	Ca
pH da solução	1	2,40E+06 ^{NS}	3,04E+06 ^{NS}	9,39E+05***	1,45E+04 ^{NS}
Patógeno (Pb)	1	6,18E+06 ^{NS}	2,22E+07**	1,3E+06***	1,01E+07 ^{NS}
pH x Pb	1	3,60E+04 ^{NS}	1,14E+07 ^{NS}	3,5E+05***	6,62E+07 *
Erro	12	5,37E+06	4,23E+06	7,8E+03	1,50E+07
CV%		45,35	26,64	4,42	9,97
Concentração de Al (Al)	2	1,15E+09 ***	4,46E+07***	5,92+05***	4,85E+08 ***
Patógeno (Pb)	1	2,74E+07 ^{NS}	3,46E+07***	2,32+06***	3,36E+07**
Al x Pb	2	6,46E+06 ^{NS}	4,59E+06 *	1,48+05***	3,74E+07***
Erro	18	3,71E+07	1,41E+06	1,21+04	5,83E+06
CV%		32,55	25,95	4,41	8,09

***F significativo a 1%; **F significativo a 5%; *F significativo a 10%; ^{NS} não significativo

