

GILCIANNY PIGNATA CAVALCANTE

**ATIVIDADE DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA
SOBRE TRÊS PATÓGENOS BACTERIANOS DO TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C376a
2009

Cavalcante, Gilciany Pignata, 1980-

Atividade de extratos de plantas medicinais da Amazônia sobre três patógenos bacterianos do tomateiro / Gilciany Pignata Cavalcante. – Viçosa, MG, 2009.
ix, 43f. : il (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Rogério de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tomate - Doenças e pragas - Controle biológico.
2. Bactérias fitopagênicas. 3. Plantas medicinais.
4. *Clavibacter michiganensis*. 5. *Ralstonia solanacearum*.
6. *Pseudomonas syringae*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.6429932

GILCIANNY PIGNATA CAVALCANTE

**ATIVIDADE DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA
SOBRE TRÊS PATÓGENOS BACTERIANOS DO TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de fevereiro de 2009.

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Co-orientador)

Prof. Vicente Wagner Dias Casali
(Co-orientador)

Prof. Silamar Ferraz

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro

Prof. José Rogério de Oliveira
(Orientador)

À DEUS,

Aos meus pais, Gilson Batista Cavalcante (*in memorian*) e Dora Silvia Pignata Cavalcante, pelo amor e dedicação, à minha querida irmã Gilianny pelo estímulo e carinho, minha avó Maria (*in memorian*) pelo incentivo, e aos meus amigos.

Os velozes nem sempre vencem a corrida

Os fortes nem sempre triunfam na guerra

Os prudentes nem sempre são ricos

Os instruídos nem sempre tem prestígio

Pois o tempo e o acaso afetam a todos

(Eclesiastes 9.11)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre está comigo nos momentos mais difíceis não permitindo que eu desista dos meus sonhos, sempre me dando sabedoria e coragem para prosseguir.

Aos meus pais Gilson e Dora, exemplos de honestidade, pela educação que me deram e pelo esforço em sempre me proporcionar o melhor. Tudo que tenho e tudo que sou devo ao incentivo e apoio que eles sempre me deram. Especialmente minha mãe que contribuiu direta e indiretamente para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida.

À minha amada irmã Gilianny Nickerson, por tudo que tem feito por mim, pelos conselhos, incentivos, sempre me dizendo que eu posso e vou conseguir.

Ao meu cunhado Tory Nickerson que é como um irmão para mim.

Ao meu sobrinho Noah, que é a prova real de que Deus existe e pode fazer milagres em nossa vida.

Ao professor José Rogério de Oliveira que foi como um pai, pelos ensinamentos transmitidos, amizade e exemplo de honestidade.

Ao professor Luiz Antonio Maffia, pelo seu incentivo, dicas valiosas e ajuda em todos os momentos que precisei.

Ao professor Vicente Wagner Dias Casali, sempre muito paciente, pela colaboração, críticas e sugestões.

Aos professores Reginaldo da Silva Romeiro e Silamar Ferraz, pelas dicas, críticas e sugestões.

À Maria Sueli de Oliveira Cardoso, pela amizade, ensinamentos e por transmitir sua experiência de anos no laboratório de bacteriologia.

À Ivanete Tonole da Silva, pela sua amizade, pelos seus conselhos e por compartilhar suas experiências comigo.

Aos amigos Fabiana, Silvino, Caio e Gustavo que ajudaram na execução dos experimentos em casa de vegetação.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa por compartilharem suas experiências e ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo auxílio financeiro durante toda a execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial o Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade que me deram de realizar o curso de Mestrado.

Aos funcionários da casa de vegetação Dagoberto e Fizinho que sempre me ajudaram em todos os momentos que precisei.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Rita, Bráz, Jésus, Camilo, Eloy e Délio por todas as informações, ajuda e gentilezas.

Aos meus amigos da Igreja Batista que sempre me apoiaram e oraram por mim nos momentos de dificuldades.

Ao Gustavo, que sempre me ajudou nos momentos em que eu me sentia sozinha em Viçosa, um grande amigo para todos os momentos.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO GERAL	3
LITERATURA CITADA	7

CAPÍTULO 1

EFEITO *in vitro* DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM ATIVIDADE SOBRE TRÊS PATÓGENOS BACTERIANOS DO TOMATEIRO.

RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	15
1. Obtenção dos isolados	15
2. Obtenção das plantas utilizadas nos experimentos	15
3. Preparo dos extratos aquosos	16
4. Preparo dos extratos hidro-etanólicos	16
5. Óleos essenciais e seivas vegetais	17
6. Seleção dos extratos	17
6.1- Seleção dos óleos essenciais e seivas vegetais	17
6.2- Seleção dos extratos aquosos e hidro-etanólicos	18
7. Atividade de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal sobre os três patógenos e determinação do índice de repressão (IR) dos extratos	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
LITERATURA CITADA	23

CAPÍTULO 2

EFEITO *in vivo* DE EXTRATOS DE PLANTAS DA REGIÃO AMAZÔNICA SOBRE TRÊS BACTERIOSES DO TOMATEIRO

RESUMO	27
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
1. Obtenção das mudas de tomateiro	30
2. Aplicação de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal no controle de três bacterioses do tomateiro	30
2.1- Efeito de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal <i>in vivo</i> sobre a pinta bacteriana	31

2.2- Efeito de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal <i>in vivo</i> sobre o cancro bacteriano	32
2.3- Efeito de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal <i>in vivo</i> sobre a murcha bacteriana	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
Murcha bacteriana	34
Pinta bacteriana	35
Cancro bacteriano	37
LITERATURA CITADA	40

RESUMO

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Atividade de extratos de plantas medicinais da Amazônia sobre três patógenos bacterianos do tomateiro.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-orientadores: Luiz Antonio Maffia e Vicente Wagner Dias Casali.

A utilização de extratos vegetais para o controle de bacterioses de plantas tem sido pouco estudada. O uso desses produtos pode ser mais uma alternativa como parte das medidas de manejo de bacterioses de plantas, principalmente devido à falta de um produto eficiente para o controle dessas doenças. As plantas, assim como todos os organismos vivos, possuem rotas metabólicas que são fundamentais para sua sobrevivência. No entanto, as plantas também são capazes de produzir substâncias denominadas metabólitos secundários que possuem várias funções importantes como proteção contra o ataque de microorganismos fitopatogênicos. O trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de EAs, EHEs, SVs e óleos essenciais de plantas medicinais da Região Amazônica contra três bacterioses do tomateiro: cancro bacteriano, murcha bacteriana e pinta bacteriana. Foram selecionados somente os extratos que inibiram completamente o crescimento das três bactérias. O índice de repressão destes extratos, em várias concentrações, foi determinado. O EA AM15 apresentou 100% de repressão às três bactérias testadas, seguido da SV AM16 com o índice de repressão de 100% para *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tomato*. Estes extratos selecionados foram avaliados em casa de vegetação no manejo das três doenças. Os EAs e a SV foram utilizados nas plantas de duas formas: pulverizados na parte aérea e regados no solo. No controle da murcha bacteriana os efeitos dos extratos foram dependentes da temperatura. Para a pinta bacteriana dois extratos aplicados no solo na forma de rega exerceram efeito

satisfatório, enquanto o oxiclreto de cobre não foi eficiente contra a doença. Quanto ao cancro bacteriano os extratos aplicados na forma de rega foram mais eficientes. Esses resultados mostram o potencial desses extratos no manejo de doenças causadas por bactérias.

ABSTRACT

CAVALCANTE, Gilcianny Pignata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2009. Activity of medicinal plant extracts from the Amazon on three bacterial pathogens of tomato. Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-advisers: Luiz Antonio Maffia and Vicente Wagner Dias Casali.

The use of plant extracts for the control of plant bacteria has been little studied. Use of these products may be an alternative as part of bacterial plant management, mainly due to lack of an effective product to control these diseases. Plants, like all living organisms, have metabolic routes that are vital for their survival. However, plants are also capable of producing substances called secondary metabolites which have several important functions, such as protection against attack by phytopathogenic microorganisms. The study aimed to evaluate the activity of EAs, EHEs, SVS and essential oils of medicinal plants of the Amazon region against three tomato bacterial: bacterial canker, bacterial wilt and bacterial speck. We only selected extracts that completely inhibited growth of the three bacteria. The rate of repression of these extracts was determined in various concentrations. EA AM15 presented 100% repression of the three bacteria tested, followed by SV AM16 with the rate of repression of 100% for *R. solanacearum* and *P. syringae* pv. *tomato*. These selected extracts were evaluated in a greenhouse for management of the three diseases. The EAs and SV were used in plants in two ways: spraying on the leaves and injected in the soil. Effects of the extracts on control of wilt bacterial were dependent on temperature. For the bacterial speck two extracts applied to soil had a good effect, while copper oxychloride was not effective against the disease. In regards to the bacterial canker, extracts applied to the soil were more efficient. These results show the potential of these extracts in the management of plant diseases caused by bacteria.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), originário do continente Sul Americano, é uma das hortaliças mais consumidas mundialmente, devido à versatilidade no uso, aos valores nutricionais, maior vida útil que outras hortaliças e uso no processamento industrial (Tigchelaar 1991). Em 2007, a produção brasileira de tomate foi de aproximadamente 3.357 milhões de toneladas, com a produtividade média de 59,6 t/ha (IBGE, 2007). A cultura está sujeita a várias doenças que podem limitar a sua produção, como o cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* e a pinta bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Devido a estes problemas fitossanitários, o tomateiro é alvo de constantes aplicações de produtos químicos, aumentando os custos de produção, intoxicando os seres humanos e o meio ambiente. Por outro lado, o Brasil possui grande extensão de florestas e matas com diversidade genética vegetal enorme, em muitas espécies o produto tem atividade biológica, com potencial benéfico ou maléfico sobre vários organismos (Brown *et al.*, 1989; Almeida, 1993). A Amazônia contém mais de 5,5 milhões de quilômetros quadrados de floresta tropical com mais de 25 mil plantas nativas (IBAMA, 2003; Carlini, 2009). Este potencial genético e os conhecimentos tradicionais da Amazônia têm gerado interesses internacionais com conseqüências desastrosas, devido à apropriação de recursos genéticos por meio de patenteamento por empresas estrangeiras, sem ocorrer a transferência desta tecnologia ou benefícios ao país. Dentre os produtos patenteados estão: o cupuaçu (*Theobroma grandiflora*), a andiroba (*Carapa guianensis*) e copaíba (*Copaifera* sp.). Um caso que provocou indignação da sociedade brasileira foi o do patenteamento do processo de obtenção de óleo de cupuaçu para a fabricação de

chocolate (cupolate), patenteado por uma empresa japonesa (Mascarenhas, 2004). O estudo e uso da atividade biológica de compostos secundários presentes em extratos brutos ou óleos essenciais de plantas pode, juntamente com a indução da resistência, tornar-se uma alternativa importante no manejo de doenças em plantas cultivadas (Dias, 1993). Entretanto, o conteúdo dos compostos ativos de plantas medicinais pode ser afetado por vários fatores: variação genética, diferenças no conteúdo de compostos ativos em várias partes da planta ou durante seu crescimento e influências ambientais (Furlani, 2009).

Em diversas plantas utilizadas na medicina popular foram encontradas atividades antibacterianas e, desta forma, foi estabelecida a seguinte hipótese de trabalho: plantas usadas na medicina popular podem ser utilizadas no manejo de doenças bacterianas de plantas. Para testar a hipótese, estabeleceu-se o objetivo geral, que foi conhecer o potencial de algumas plantas utilizadas na medicina popular na Amazônia, no manejo do cancro bacteriano, da pinta bacteriana e da murcha bacteriana do tomateiro. Especificamente objetivou-se: 1) determinar a atividade *in vitro* de extratos aquosos (EAs), extratos hidro-etanólicos (EHEs), seivas vegetais (SVs) e óleos essenciais de espécies de plantas utilizadas na medicina popular na Amazônia sobre três patógenos bacterianos do tomateiro: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* e *R. solanacearum*; 2) avaliar a eficiência dos extratos selecionados, em diversas concentrações, na repressão das três fitobactérias; 3) verificar a eficiência dos extratos selecionados no manejo das doenças causadas pelas três bactérias, por meio de pulverização foliar em casa de vegetação e por meio da aplicação direta no solo em forma de rega.

REVISÃO GERAL

O tomateiro por ser cultivado em todas as regiões do Brasil está dentre as hortaliças mais populares. Atualmente, o tomateiro é a segunda cultura em importância econômica, sendo superada apenas pela batata. Várias doenças ocorrem no tomateiro e podem limitar sua produção, dependendo do nível de resistência genética da cultivar.

Dentre as principais doenças que ocorrem no tomateiro a murcha-bacteriana, causada por *R. solanacearum* (Smith 1896), está destacada dentre as principais em regiões tropicais e subtropicais. O manejo desta doença é muito complexo, em vista à alta capacidade de sobrevivência da bactéria no solo e a vulnerabilidade genética das variedades. Temperaturas elevadas e alta umidade do solo são condições determinantes para que ocorram epidemias desta doença. O controle é difícil, porque não estão disponíveis cultivares com alta resistência e nenhum procedimento individual é satisfatório, fazendo-se necessário o uso de métodos integrados de controle, como práticas culturais, rotação de culturas e cultivares resistentes, as quais podem prover limites à expansão destrutiva da bactéria (Lopes & Ávila, 2005; Pradhanang *et al.*, 2003).

O cancro-bacteriano, causado pela bactéria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith 1910), é freqüente em tomateiro convencional estaqueado, cuja condução requer manejo intensivo das plantas, em vista das operações de desbrota e amarração. A ocorrência da doença depende de fatores climáticos, grau de infestação do solo e qualidade das sementes utilizadas no plantio. As condições ideais do desenvolvimento da doença são temperatura entre 24°C e 28°C, baixa intensidade luminosa e alta umidade do solo, ou seja, entre 40 e 80% da capacidade de campo (Galli & Tokeshi, 1979; Tokeshi e Carvalho, 1980; Robbs, 1985). A prevenção pode ser feita por meio do uso de sementes livres da bactéria e da esterilização do substrato de

produção de mudas. Pode-se usar o Cobre, estreptomicina e outros antibióticos registrados na sementeira ou na lavoura (Agrios, 2005; Lopes & Ávila, 2005).

P. syringae pv. *tomato* (Okabe, 1933), agente causal da pinta bacteriana, é mais comum em regiões onde ocorrem simultaneamente temperaturas amenas (18°C a 25°C) e umidade relativa do ar acima de 90%. A prevenção pode ser feita por meio de sementes de boa qualidade, mudas saudáveis, cultivares resistentes e medidas de controle cultural. Podem ser aplicados periodicamente na lavoura fungicidas à base de cobre e antibióticos registrados, porém o desenvolvimento de populações bacterianas resistentes pode ocorrer (Lopes & Ávila, 2005).

Em decorrência dos danos que os pesticidas vêm causando ao homem e à natureza, é imprescindível adotar medidas alternativas de controle, como o uso de produtos naturais eficientes e de baixo impacto ambiental (Silva *et al.*, 2005). Dentre estes compostos, destacam-se: óleos essenciais, alcalóides, lipídeos, taninos, aminoácidos, carboidratos, quitina e lectinas. Um grande entrave no uso destes produtos é a quantidade e a variabilidade de sua composição química. Dependem do tipo de tecido, da idade, habitat e do tipo de solo onde a planta é cultivada. Existem algumas plantas que possuem variabilidade na sua constituição química até mesmo de acordo com as estações do ano (Silva, 2006; Casali, 2009). Esses compostos, também denominados de metabólitos secundários, têm potencial de ação sobre diversas doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides. Entretanto, há poucos estudos em que testaram estes compostos no controle de bactérias fitopatogênicas.

Satish *et al.* (1999) utilizaram extratos aquosos de 30 plantas e avaliaram, *in vitro*, a atividade bactericida para patovares da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris*. Após a obtenção dos extratos, por meio da maceração de folhas, a atividade bactericida dos extratos foi testada pelo método de difusão em meio nutriente ágar. Dos

30 extratos aquosos utilizados, oito tiveram significativa atividade bactericida, evidenciadas pela zona de inibição, quando comparados aos antibióticos sintéticos “bacterimycin” e “streptocycline”.

Rheedia gardneriana Planch. & Triana (Bacuparí), planta da família *Clusiaceae*, encontrada na região Amazônica foi avaliada por Santos *et al.* (1999) quanto a sensibilidade à fitobactérias e enterobactérias, *in vitro*, a extratos desta planta. Foram testadas as bactérias fitopatogênicas: *Agrobacterium tumefaciens*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas* sp., *R. solanacearum* e *Erwinia* sp. As enterobactérias testadas foram: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. A epi-clusianona e o ácido oleanóico, isolados do fruto, inibiram o crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes*. A epi-clusianona inibiu o crescimento das fitobactérias *Pseudomonas* sp. e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Curtis *et al.* (2004) utilizaram o extrato de alho (*Allium sativum* L.) no controle de bactérias, fungos e Oomycetes. A efetividade do extrato foi testada *in vitro* frente vários organismos fitopatogênicos. A atividade *in vitro* de alicina (princípio antimicrobiano do alho identificado como diallylthiosulphinate), contra *E. coli*, foi comparada aos antibióticos convencionais ampicilina e kanamicina. *In vitro* o extrato inibiu as bactérias fitopatogênicas *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *P. syringae* pv. *maculicola*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P.s.* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Loguercio *et al.* (2005) obtiveram resultados em testes realizados com extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L) Skells), família *Mirtaceae*, oriunda da Índia oriental. Frente a 17 isolados bacterianos, gram-positivos e gram-negativos, de importância patogênica aos animais e humanos. O extrato inibiu o

crescimento de 100% das bactérias testadas. Segundo Morton (1987) as folhas de jambolão são ricas em taninos e saponinas. Conforme vários autores (Loguercio *et al.* 2005; Khan *et al.*, 2001; Srinivasan *et al.*, 2001; Cimanga *et al.*, 2002), existe relação entre o teor de taninos e a atividade contra bactérias gram-positivas.

LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G.N. Plant Diseases Caused by Prokaryotes: Bacteria and Mollicutes. In: AGRIOS, G.N. Plant Pathology. University of Florida: Elsevier Academic Press. 5 (Ed). p.651-653. 2005.
- ALMEIDA, E.R. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo, 341 p. 1993.
- BROWN, L.R. FLAVIN, C & POSTEL, S. A world at risk. In: BROWN, L.R. (Ed.), State of the World. W.W. Norton co, New York, p.1-6. 1989.
- CARLINI, E. A. O primeiro remédio brasileiro. Disponível em <http://www.unifesp.br/comunicação/jpta/ed120/pesq1.htm>. Acesso em 15/01/2009.
- CASALI, V. W. D. Princípio ativo de plantas medicinais depende de uma série de fatores. Disponível em <http://www.revista.fapemig.br/11/fitotecnia.htm>. Acesso em 14/11/2009.
- CIMANGA, K. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*. 79(2): 213-220. 2002.
- CURTIS, H., NOLL, U., STORMANN, J. & SLUSARENKO, A.J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65: 79-89. 2004.
- DIAS, F.L. Estudo da genotoxicidade in vivo e in vitro dos cercaricidas naturais, óleo de sucupira e cremantina em células de mamíferos. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, São Paulo. 105 p. 1993.
- FURLANI, P. R. Disponível em www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br. Acesso em 10/01/2009.

- GALLI, F., TOKESHI, H. Doenças do tomateiro. In: MINAMI, K., HAAG, H. P. O tomateiro. Campinas: Fundação Cargill, p.240-294. 1979.
- KHAN, M.R. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. Fitoterapia. 72(7): 825-828. 2001.
- KRONKA, A.Z. Cancro bacteriano do tomateiro: metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle (Tese de doutorado). Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2004.
- LOGUERCIO, A.P., BATTISTIN, A., VARGAS, A.C., HENZEL, A. & WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). Ciência rural. 35 (2): 371-376. 2005.
- LOPES, C.A. & QUEZADO, A.M. Doenças bacterianas. In: doenças do tomateiro LOPES, C.A. & ÁVILA, A.C. Embrapa hortaliças. Brasília, p. 55-67. 2005.
- MASCARENHAS, G.C.C. A biodiversidade brasileira no âmbito do acordo TRIPS. Revista brasileira de inovação. v. 3, n.2, p. 393-416. 2004.
- MINAMI, K. & HAAG, H.P. O tomateiro. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill. 397p. 1989.
- MORTON, J. JAMBOLAN. In: Morton, J. Fruits of warm climates. Miami: Creative resources systems. p. 375-378. 1987.
- ROBBS, C. F. Doenças causadas por bactérias. Informe agropecuário, v. 11, n.131, p. 45-50. 1985.
- SANTOS, M.H., OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J., OLIVEIRA, J.R., QUEIROZ, M.E.L.R. & LIMA, R.D. Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* (bacuparí) sobre bactérias patogênicas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 35(2): 297-301. 1999.
- SILVA, G.S. Palestra: Substâncias naturais: uma alternativa para o controle de doenças. Fitopatologia Brasileira 31(supl): 14. 2006.

- SILVA, I.D., TAKATSUKA, F.S., ROCHA, M.R. & CUNHA, M.G. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emerginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 35 (2): 109-115. 2005.
- SATISH, S., RAVEESHA, K.A. & JANARDHANA. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. *Applied Microbiology*. 28: 145-147. 1999.
- SRINIVASAN, D. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology, Limerick*. 74(2) 217-220. 2001.
- TIGCHELAAR, E.C. Botany and culture. In: JONES, J.B., JONES, J.P., STALL, R.E. & ZITTER, T.A. (Ed.). *Compendium of tomato diseases*. St. Paul: APS Press, P. 2-4. 1991.
- TOKESHI, H., CARVALHO, P. C. T. Doenças do tomateiro – *Lycopersicon esculentum* Mill. In: Galli, F. (Ed). *Manual de Fitopatologia – doenças das plantas cultivadas*. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2. p.511-552. 1980.

CAPÍTULO 1

EFEITO *in vitro* DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO
AMAZÔNICA COM ATIVIDADE SOBRE TRÊS PATÓGENOS BACTERIANOS
DO TOMATEIRO.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de EAs, EHEs, SVs e óleos essenciais de plantas medicinais da Região Amazônica contra três bacterioses do tomateiro: cancro bacteriano, murcha bacteriana e pinta bacteriana. Utilizaram-se 24 espécies de plantas da região amazônica, pertencentes a 17 famílias botânicas, nos testes *in vitro*. Foram selecionados somente os extratos que inibiram completamente o crescimento das três bactérias. O índice de repressão destes extratos, em várias concentrações, foi determinado nas bactérias em estudo. O melhor tratamento foi com o EA AM15, 100% de repressão às três bactérias testadas, seguido da SV AM16 com o índice de repressão de 100% para *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tomato*.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the activity of EAs, EHEs, SVs and essential oils of medicinal plants from the Amazon region against three tomato bacterial: bacterial canker, bacterial wilt and bacterial speck. We used 24 plant species of the Amazon region, belonging to 17 botanical families for tests *in vitro*. Only extracts that completely inhibited growth of three bacteria were selected. The rate of repression of these extracts, in various concentrations, was determined in the bacteria under study. The best treatment was with EA AM15, presenting 100% repression of the three tested bacteria, followed by SV AM16 with the rate of repression of 100% for *R. solanacearum* and *P. syringae* pv. *tomato*.

INTRODUÇÃO

Todos os seres vivos possuem rotas metabólicas de síntese e de utilização dos compostos orgânicos essenciais: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e polímeros derivados. Esses metabólitos denominados primários são essenciais na sobrevivência dos organismos. As plantas também produzem uma ampla diversidade de compostos orgânicos importantes, os quais são denominados de produtos secundários ou metabólitos secundários, ativos na defesa das plantas, protegendo contra o ataque de herbívoros e de fitopatógenos, atraindo polinizadores e atuando como agentes na competição planta-planta (Taiz & Zeigler, 1991). Estas defesas das plantas são de natureza química, e envolvem substâncias do metabolismo secundário, também conhecidas como por fitotoxinas ou aleloquímicos (Pinto *et al.*, 2002).

A atividade antimicrobiana de extratos de plantas já foi demonstrada por vários pesquisadores. Entretanto há poucos trabalhos visando o controle das doenças causadas por bactérias fitopatogênicas. Dentre os extratos testados destacam-se: própolis, extrato cítrico e óleos essenciais (Basim *et al.* 2006; Motoyama *et al.* 2003; Daferera *et al.* 2003; Klink *et al.*, 1995). O uso dos extratos vegetais no controle de fitopatógenos tem algumas vantagens sobre o uso de produtos sintéticos (Quarles, 1992), como: são menos tóxicos por serem menos concentrados, são rapidamente degradados, tem amplo espectro de uso e ação seletiva, o que resulta em menor probabilidade de desenvolvimento de resistência. Podem também ser utilizados pelos próprios agricultores ou em cultivos orgânicos, e eventualmente, o princípio ativo ser sintetizado pela indústria (Pascual-Villalobos, 1996). Deste modo, o objetivo do trabalho foi selecionar EAs, EHEs, SVs e óleos essenciais de várias espécies de plantas utilizadas na medicina popular na Amazônia para avaliar atividade antimicrobiana *in vitro* de três patógenos bacterianos do tomateiro: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae*

pv. tomato e *R. solanacearum*, bem como avaliar a eficiência dos extratos selecionados, em várias concentrações, na repressão das três fitobactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Bacteriologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, de março de 2008 a fevereiro de 2009.

1. Obtenção dos isolados

Os isolados de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* e *R. solanacearum* foram utilizados em testes *in vitro* e em casa de vegetação. Pertencem à coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Patologia de Sementes. O meio de cultura utilizado na repicagem e no preparo de inóculo foi o meio 523 de Kado & Heskett (1970).

2. Obtenção das plantas utilizadas nos experimentos

Efetuarão-se coletas em feiras livres e mercados nas cidades de Boa Vista- RR e Manaus- AM para a obtenção das plantas. Coletaram-se óleos essenciais, seivas vegetais, frutos, folhas e sementes. Algumas plantas foram escolhidas por seus efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios já conhecidos. Foram selecionadas, também, plantas ainda não estudadas, mas utilizadas na medicina popular na Região Amazônica. Foram obtidas 24 plantas, pertencentes a 17 famílias botânicas, as quais foram designadas AM1, AM2, AM3... AM24. As plantas foram armazenadas em sacos plásticos fechados e etiquetadas, permanecendo em local escuro, arejado e seco, sem acesso de insetos e fungos.

3. Preparo dos extratos aquosos

Na obtenção do EA foi utilizado o método descrito por Ferris & Zheng (1999) com modificações. Foram misturados, separadamente, 1g de cada planta com 10 mL de água destilada esterilizada, e a mistura mantida em frascos cobertos com papel alumínio. Foram mantidos sob agitação em mesa agitadora orbital (Marconi[®] - MA 140 CFT) à velocidade de 115.0 rpm, por 1 h. Após 24 h o EA foi filtrado em gaze, teve seu volume medido com auxílio de uma proveta e completado a 10 mL com água destilada esterilizada, devido a perdas com evaporação ocorridas durante o preparo. Posteriormente, foram centrifugados (Sorval RC-5B Refrigerated Superspeed centrifuge) a 4°C e 7.796g, durante 20 min. A centrifugação foi realizada para que o extrato, posteriormente, pudesse passar através das unidades filtrantes Millex[®] para a sua esterilização. Os EAs foram utilizados imediatamente após o preparo.

4. Preparo dos extratos hidro-etanólicos

Foi realizado o processo de acordo com Martins *et al.* (1994) no preparo da tintura. As plantas foram adicionadas a erlenmeyers envolvidos por papel alumínio utilizando-se 1g de planta seca para 10 mL de etanol 70%. Os frascos foram deixados à temperatura ambiente, protegidos da luz, por 10 dias, sendo submetidos à agitação em mesa agitadora orbital (Marconi - MA 140 CFT) a 115.0 rpm, 1 h/dia. Posteriormente, foram centrifugados (Sorval RC-5B Refrigerated Superspeed centrifuge) a 4°C e 7.796g durante 20 min. Ao final, as tinturas foram filtradas em gaze, e foi realizado o procedimento de evaporação do etanol, em chapa aquecedora a 80°C. Após a completa evaporação do álcool, o volume foi completado para 10 mL com água destilada

esterilizada, resultando no EHE. Os EHEs foram utilizados imediatamente após o preparo.

5. Óleos essenciais e seivas vegetais

Utilizaram-se os óleos essenciais e as SVs na mesma forma que estavam quando foram adquiridos nas feiras livres e mercados.

6. Seleção dos extratos

Inicialmente foi realizado o bioensaio qualitativo visando à seleção dos EAs, EHEs, óleos essenciais e SVs que inibiram o crescimento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* e *R. solanacearum*.

6.1- Seleção dos óleos essenciais e seivas vegetais

Os óleos essenciais e SVs foram testados na concentração de 2,0%. Foi retirado 1 mL de cada composto e adicionado a 1 mL de Tween 80 a 0,02%, seguido de agitação manual durante 30 segundos, promovendo a homogeneização. Na adição ao meio 523 utilizou-se a técnica de diluição em ágar, em que se verteram 2 mL do composto em 48mL de meio 523 fundente, juntamente com 0,5mL de ciclohexamida para evitar a contaminação por fungos (Hood *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005 & Soberón *et al.*, 2006). Após a adição ao meio, foram imediatamente vertidos em placas de Petri e semeados com as bactérias *R. solanacearum*, *P. syringae* pv. *tomato* ou *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, incubando-se a $28^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. A concentração das suspensões bacterianas foi

ajustada a $OD_{600} = 0,1$. As avaliações qualitativas foram efetuadas com 24, 48 e 72 h após a semeadura das bactérias, e se observou se houve a inibição do crescimento bacteriano em relação aos controles: meio 523 e meio 523 + 2 mL de Tween 80/água destilada esterilizada (1:1 v/v). Avaliaram-se 11 tratamentos, com três repetições, onde uma placa de Petri corresponde a uma unidade experimental. A seleção dos óleos essenciais e SVs foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado.

6.2- Seleção dos extratos aquosos e hidro-etanólicos

Após a extração, foram esterilizados em unidades filtrantes Millex®, com membrana de 0,22 μ m. Foram utilizados na concentração de 10%, adicionando-se 5 ml de extrato a 45 ml de meio 523 fundente, juntamente com 0,5mL de ciclohexamida. O meio 523, sem a adição dos extratos, 523/etanol 70% após a evaporação e 523/água destilada esterilizada foram os controles. Ajustou-se a concentração das bactérias a $OD_{600} = 0,1$ e semeou-se com o auxílio de alças plásticas calibradas de 10 μ L, incubando-se a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. As avaliações qualitativas foram realizadas com 24, 48 e 72 h após a semeadura das bactérias em placas de Petri. Foram avaliados 19 tratamentos, com três repetições, onde uma placa de Petri corresponde a uma unidade experimental. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado.

7. Atividade de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal sobre os três patógenos e determinação do índice de repressão (IR) dos extratos

Nos ensaios realizados para a determinação do IR, utilizaram-se os dois EAs e uma SV selecionados em experimento anterior, e foram testados nas seguintes

concentrações: 0; 0,1; 0,5; 1,0% (SV) e 0; 2,5; 5,0; e 10% (EAs). As suspensões bacterianas tiveram suas concentrações ajustadas a $OD_{600} = 0,1$. Realizaram-se quatro diluições das suspensões bacterianas (fator 1:100) em solução salina esterilizada contendo 0,5% de Tween 80. Posteriormente, semearam-se 10 μ L de cada diluição, utilizando-se alça calibrada de 10 μ L, no meio 523 contendo as concentrações da SV e dos EAs. As placas de Petri foram mantidas em incubadora a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24, 48 e 72 h e as avaliações foram feitas por meio da contagem do número (Unidades Formadoras de Colônia/mL) UFC/mL. Após a quantificação, determinou-se o IR, segundo a fórmula:

$$\text{IR} = \frac{\text{média UFC/mL meio 523} - \text{média UFC/mL meio semi-seletivo}}{\text{média UFC/mL meio 523}} \times 100$$

Como controle utilizou-se o meio de cultura 523 com Tween 80/água destilada esterilizada e somente meio 523, cada placa de Petri correspondeu uma unidade experimental. O ensaio foi realizado com três repetições. Nos meios que permitiram o crescimento das três bactérias testadas, foi feita a quantificação do número de colônias de *R. solanacearum*, *P. syringae* pv. *tomato* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e determinado o IR. As diluições utilizadas nos cálculos do IR no meio 523 e nos meios com extratos variaram de acordo com a bactéria, com o extrato adicionado ao meio, bem como com as concentrações testadas. Os dados coletados (UFC/mL) foram transformados em \log_{10} e a média e o erro padrão dos tratamentos foram calculados no programa SAS System versão 8.0.

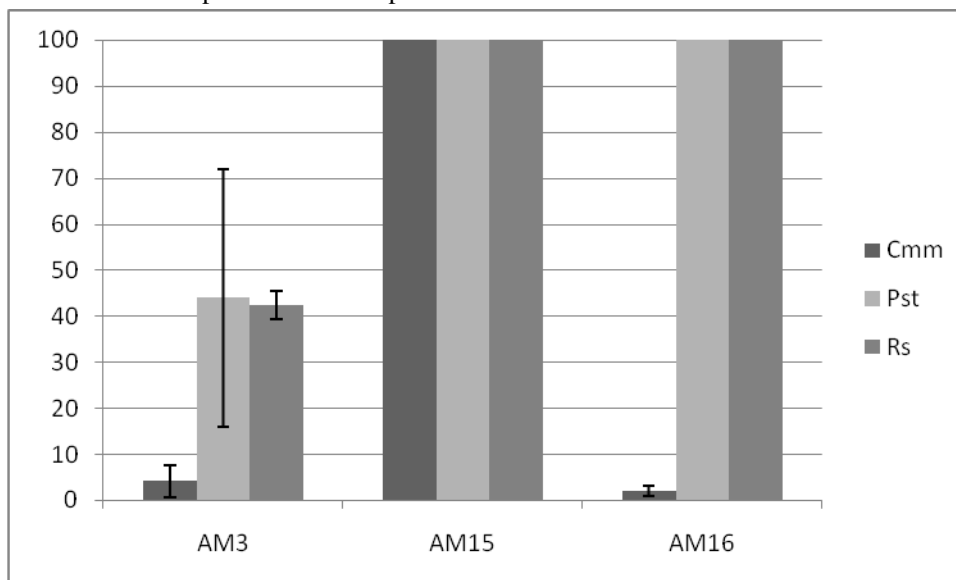
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios realizados com os EAs, EHEs, SVs e óleos essenciais, foram selecionados apenas os compostos que inibiram completamente o crescimento das três fitobactérias em estudo. Dois EAs e EHEs (AM3 e AM15) e uma SV (AM16) inibiram completamente o crescimento das três fitobactérias testadas. Com vários extratos obtiveram-se resultados promissores para cada bactéria. Os EAs com melhores resultados *in vitro* na inibição do crescimento de *R. solanacearum* foram: AM3, AM6, AM9, AM14, AM15 e AM23. Os EHEs foram: AM3, e AM15, e as SVs: AM14, AM16 e AM20. Os melhores resultados em *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* dos EAs e dos EHEs foram: AM3 e AM15. Dentre os óleos essenciais AM1 e AM7 e a SV AM16. Quanto a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* os EAs selecionados foram AM3, AM6, AM9 e AM15, os EHEs AM3 e AM15, o óleo essencial AM18 e as SVs AM16 e AM20. Como os efeitos inibitórios dos EHEs e EAs selecionados foram iguais nas três bactérias, o método de preparo selecionado para a avaliação quantitativa foi o do EA.

O meio com o EA AM3 foi selecionado na concentração de 10% e teve IR baixo em todos os organismos testados, *R. solanacearum* (40,94%), *P. syringae* pv. *tomato* (19%) e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (2,96%). Já o meio com o EA AM15 foi selecionado na concentração de 2,5% em *P. syringae* pv. *tomato* e *R. solanacearum* e na concentração de 5,0% em *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, proporcionando completa inibição do crescimento das três bactérias testadas (IR= 100%). A SV AM16 foi utilizada na concentração de 0,5% em *P. syringae* pv. *tomato* e *R. solanacearum* e 1% em *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, com IR de 100% nas bactérias *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tomato* e 0,55% em *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Esses resultados permitem concluir que o melhor desempenho foi do EA

AM15 porque promoveu a inibição do crescimento *in vitro* das três fitobactérias testadas.

Figura 1- Repressão do crescimento de três patógenos bacterianos do tomateiro por dois EAs e uma SV. Dados calculados a partir de média do Log10 do número de UFC/mL. Barras verticais representam o erro padrão da média.



Legenda: AM3 e AM15 (EAs), AM16 (SV). *Cmm* (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*), *Pst* (*P. syringae* pv. *tomato*) e *Rs* (*R. solanacearum*).

Estes ensaios preliminares demonstram o potencial biológico dos dois EAs e da SV contra os três patógenos bacterianos do tomateiro estudados, incentivando novas pesquisas com estas substâncias isoladas com o intuito de se determinar os constituintes químicos responsáveis por tal atividade. As diferenças encontradas na atividade dos compostos em relação às três bactérias testadas podem ser explicadas tanto pela constituição da parede celular bacteriana, quanto pela diversidade da composição dos EAs e da SV. As bactérias gram-positivas têm a estrutura celular mais rígida e uma parede celular menos complexa e com menor teor lipídico do que as gram-negativas (Romeiro, 2005). Talvez por isso, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, que é gram positiva, tenha sido menos afetada pela SV AM16. Segundo alguns autores, há uma relação entre o teor de taninos e a atividade de extratos vegetais sobre bactérias gram

positivas (Khan *et al.*, 2001; Srinivasan *et al.*, 2001; Cimanga *et al.*, 2002; Loguercio *et al.*, 2005). Um grande entrave no uso destes produtos naturais é a quantidade e sua composição química que são muito variáveis e dependem do tipo de tecido, idade da planta, habitat e tipo de solo onde a planta foi cultivada (Silva, 2006). A concentração de princípios ativos pode variar muito até durante o dia como: os alcalóides e óleos essenciais que se concentram mais pela manhã e os glicosídeos à tarde. Também a época do ano pode ter efeito nos teores de princípios ativos (Martins *et al.*, 1994). Isso pode explicar o fato da SV AM16 ter inibido completamente o crescimento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* durante a seleção dos compostos e não ter tido um bom IR, sendo que a SV utilizada na seleção foi coletada em época diferente da utilizada na quantificação do IR, podendo ter reduzido a concentração do princípio ativo ou mesmo a ausência do mesmo. Outro aspecto importante que deve ser observado é o fato dos EAs terem sido mais efetivos do que os EHEs, sendo que o método de extração do EHE utilizou como solvente o etanol 70% que tem um maior potencial de extração do que a água destilada. No entanto, o uso da chapa aquecedora a 80°C para a evaporação do etanol pode ter influenciado na perda de princípios ativos sensíveis ao calor ou até mesmo sensíveis ao próprio solvente utilizado. Portanto, conhecer a composição de extratos vegetais com potencial no manejo de doenças bacterianas de plantas é de fundamental importância. Estudos futuros com esses extratos devem ser realizados visando a determinação da sua composição química e conhecer os princípios ativos que estão atuando na inibição do crescimento bacteriano. Considerando-se que apenas 1% das espécies vegetais encontradas em florestas tropicais foi investigada quanto à sua composição química (Rodrigues-das-Dôres & Casali, 2007), torna-se ainda mais importante a realização de pesquisas nessa área, de forma a se conhecer e utilizar as plantas que ocorrem no Brasil.

LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology. San Diego: Academic Press, 635p. 1997.
- HOAN, L. T. & DAVIDE, R. G. Nematicidal properties of root extracts of seventeen plant species on *Meloidogyne incognita*. Philippine Agriculturist, 62 : 285-295. 1979.
- BASIM, E., BASIM, H. & OZCAN, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of Food Engineering. 77: 992-996. 2006.
- CIMANGA, K. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology. 79(2): 213-220. 2002.
- DAFERERA, D.J., ZIOGASB, B.N. & POLISSIOU M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection 22(1): 39-44. 2003.
- FERRIS, H. & ZHENG, L. Plant sources of Chinese herbal remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. Journal of Nematology. 31: 241-263. 1999.
- HOOD J.R, WILKINSON J.M, CAVANAGH, H.M.A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. J Essent Oil Res 15: 428-433. 2003.
- KADO, C. I., HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology, v.60, p. 969-976. 1970.
- KHAN, M.R. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. Fitoterapia. 72(7): 825-828. 2001.

- KLINK, C.A., MACEDO, R.H. & MUELLER C.C. De grão em grão, o cerrado perde espaço. In: Martins, E.S. & Alho, C.J.R. Cerrado: Impactos do processo de ocupação. WWF & PRO-CER, Brasília. 66 p. 1995.
- LOGUERCIO, A.P., BATTISTIN, A., VARGAS, A.C., HENZEL, A. & WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência rural*. 35 (2): 371-376. 2005.
- MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C. & DIAS, J.E. Plantas medicinais. Viçosa-MG. UFF, Impr. Universitária, 220 p. 1994.
- MOTOYAMA, M.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., FIORI, A.C.G. & SCAPIM, C.A. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *R. solanacearum* pv. *manihotis*. *Acta Scientiarum Agronomy*. 25(2): 509-512. 2003.
- PASCUAL-VILALOBOS, M. J. Plaguicidas naturales de origem vegetal: estado actual de la investigación Agrária y Alimentária. (Monografía, 92) p.35. 1996.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.
- QUARLES, W. Botanical pesticides from *Chenopodium*. *The IPM Practitioner*, 14 (2): 1-11. 1992.
- RODRIGUES-DAS-DÓRES. R.G. & CASALI, V.W.D. Plantas Medicinais e Aromáticas: Controle de Qualidade. Viçosa: UFV, DFT. p.19-40. 2007.
- ROMEIRO, R. S. Bactérias Fitopatogênicas. 2^a ed. Viçosa: Editora UFV, 417p. 2005.
- SILVA, I.D., TAKATSUKA, F.S., ROCHA, M.R. & CUNHA, M.G. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emerginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 35 (2): 109-115. 2005.
- SRINIVASAN, D. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick. 74(2) 217-220. 2001.

SOBERÓN, J.R., SGARIGLIA, M.A., SAMPIETRO, D.A., QUIROGA, E.N & VATTUONE, M.A. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. *Journal Applied Microbiology*. 102: 1450-1461. 2007.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Secondary Metabolites and Plant Defense and Water balance of plants. In: TAIZ, I. ZEIGER, E. *Plant Physiology*. California: The Benjamin/Cummings publishing Company, Inc. 1991.

CAPÍTULO 2

EFEITO *in vivo* DE EXTRATOS DE PLANTAS DA REGIÃO AMAZÔNICA SOBRE TRÊS BACTERIOSES DO TOMATEIRO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de dois EAs e uma SV de plantas medicinais da região amazônica, no controle de três doenças: cancro bacteriano, murcha bacteriana e pinta bacteriana do tomateiro. Os EAs e a SV foram utilizados nas plantas de duas formas: pulverizados na parte aérea e regados no solo. No controle da murcha bacteriana os efeitos dos extratos foram dependentes da temperatura. Nos experimentos realizados com a pinta bacteriana dois extratos aplicados no solo na forma de rega exerceram efeito satisfatório, enquanto o oxiclreto de cobre não foi eficiente contra a doença. Quanto ao cancro bacteriano foi eficiente um dos extratos aplicados na forma de rega. Esses resultados mostram o potencial desses extratos no manejo de doenças causadas por bactérias fitopatogênicas.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the potential of two EAs and one SV of medicinal plants in the Amazon region on control of three diseases: bacterial canker, bacterial wilt and bacterial speck of tomato. The EAs and SV were used on the plants in two ways: spraying on the leaves and application to the soil. For control of bacterial wilt, the effects of the extracts were dependent on temperature. In experiments performed with bacterial speck two extracts applied to the soil had good effects, while copper oxychloride was not effective against the disease. Against the bacterial canker, extract applied to the soil was efficient. These results show the potential of these extracts in the management of plant diseases caused by bacteria.

INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) está sujeita a várias doenças que podem limitar a sua produção. Dentre estas, as causadas por fitobactérias têm tido importância, principalmente pela falta de medidas eficientes de controle, resultando em elevadas perdas. As medidas disponíveis para o controle de bacterioses de plantas são praticamente incluídas nos princípios de exclusão e, eventualmente, a erradicação (Agrios, 1997). Não há disponíveis produtos que controlem eficientemente as doenças bacterianas de plantas. Os antibióticos têm sua ação comprometida, pois são facilmente lavados por chuvas, não são absorvidos e nem translocados na planta. Os produtos à base de cobre são pouco eficientes, pois, somente conferem proteção e não funcionam sistemicamente (Romeiro, 2005). Desta forma, qualquer procedimento alternativo se torna importante como parte das medidas integradas de manejo.

Extratos brutos e óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais, têm potencial no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação direta quanto pela indução de resistência, indicando a presença de moléculas com características eliciadoras (Pradhanang *et al.*, 2003; Balbi-Peña *et al.*, 2006; Schwan- Estrada *et al.*, 1997; Stangarlin *et al.*, 1999). A maioria dos trabalhos encontrados com a utilização de extratos de plantas no controle de bactérias é da área médica. Com o objetivo de manejo de fitobactérias, os extratos vegetais têm sido avaliados, na maioria das vezes, apenas *in vitro*. Por isso, os trabalhos realizados em casa de vegetação e em campo são importantes ao confirmarem efeitos *in vitro*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de dois EAs e uma SV, *in vivo*, no manejo de três patógenos bacterianos do tomateiro: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* e *R. solanacearum*, por meio de pulverização foliar e da aplicação direta no solo em forma de rega.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Patologia de Sementes, casa de vegetação e em câmara de crescimento, com temperatura controlada, do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, no período de março de 2008 a fevereiro de 2009.

1. Obtenção das mudas de tomateiro

As mudas de tomateiro da cultivar Santa Clara, foram produzidas em bandejas de isopor contendo substrato organo-mineral inerte (Plantmax[®]). As mudas, com idade de 25-30 dias, foram transplantadas em vasos plásticos com capacidade de 2,0 L, com substrato contendo solo, areia e esterco (2: 1: 1), esterilizado com brometo de metila. As plantas receberam adubação semanal com ouro verde, 3g/L, 40mL/vaso.

2. Aplicação de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal no controle de três bacterioses do tomateiro

Em ensaios anteriores, foram selecionados dois EAs e uma SV que inibiram completamente o crescimento de *R. solanacearum*, *P. syringae* pv. *tomato* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Foram realizados três experimentos devido às características distintas dos três patógenos bacterianos em estudo.

2.1. Efeito de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal *in vivo* sobre a pinta bacteriana

Antes da inoculação, os extratos foram pulverizados e regados. A pulverização dos extratos vegetais na superfície das folhas das plantas de tomateiro foi feita com o auxílio de um borrifador manual de jardim, até o ponto de escoamento. Tendo em vista a melhor distribuição do extrato na folha da planta foi adicionado Tween 80, na concentração de 0,1%. Em cada pulverização foi evitado que o extrato aplicado na parte aérea atingisse o solo e interferisse nos resultados, envolvendo os vasos em sacos plásticos, conforme a metodologia utilizada por Bala & Sukul (1987). Na aplicação no solo as plantas foram submetidas às mesmas condições e posteriormente a aplicação foi feita na forma de rega, 20mL/planta. Após 24 h as plantas foram colocadas em câmara de nevoeiro. Após 24 h inoculou-se, por atomização, *P. syringae* pv. *tomato*. A suspensão bacteriana foi previamente ajustada a $OD_{600} = 0,1$. Após a inoculação as plantas permaneceram por mais 48 h na câmara de nevoeiro. As plantas foram pulverizadas ou regadas a cada 10 dias, como descrito por Lopes (2004), e mantidas em câmara de crescimento com temperatura controlada de 26°C.

Foram avaliados 9 tratamentos: 1 - AM15 + Tween 80 pulverizado na parte aérea, 2 - AM15 regado no solo, 3 - AM3 + Tween 80 pulverizado na parte aérea, 4 - AM3 regado no solo, 5 - AM16 + Tween 80 pulverizado na parte aérea, 6 - AM16 regado no solo, 7 - água destilada + Tween 80 pulverizado na parte aérea, 8 - água destilada regada no solo e 9 - oxiclóreto de cobre aplicado na parte aérea (6g/L). Utilizaram-se quatro repetições por tratamento, cada planta corresponde a uma unidade experimental. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial. A avaliação da severidade nas plantas foi realizada por meio da contagem do número de

lesões nas folhas. Utilizou-se a média do número de lesões nas análises estatísticas, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. As análises foram realizadas com o programa SAS System versão 8.0.

2.2. Efeito de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal *in vivo* sobre o cancro bacteriano

A inoculação foi feita de acordo com Francis & Kabelka, (2001), por meio do corte com tesoura do pecíolo da primeira folha verdadeira da muda de tomate e imersão em suspensão bacteriana por 5 min (Figura 1). Os procedimentos de aplicação dos extratos via foliar e no solo foram os mesmos utilizados na pinta bacteriana, e as plantas de tomate foram submetidas aos mesmos tratamentos (item 2.1). O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial.

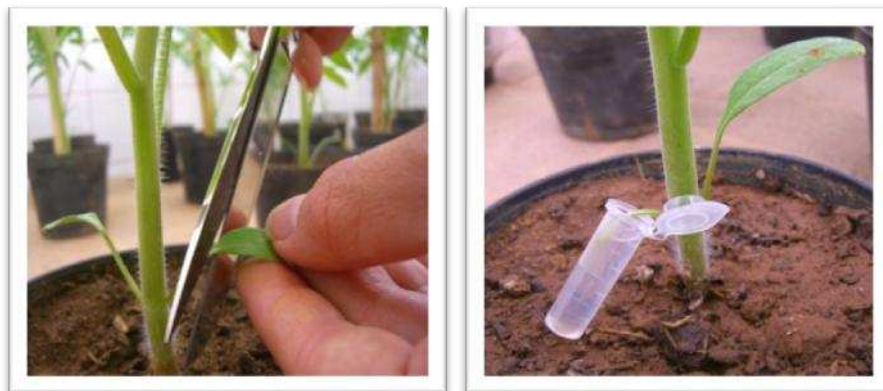


Figura 1- Corte no pecíolo da primeira folha verdadeira e imersão em suspensão bacteriana.

A avaliação da severidade nas plantas com sintomas foi realizada por meio do “Individual Disease Rating Scores” (IDRS), usando a escala descritiva de Francis & Kabelka, (2001). As notas variaram de 0 a 5, em que 0 representa a planta sem sintomas, com a adição de 1 ponto em cada sintoma: necrose marginal, murcha e cancro. A nota 5 foi atribuída às plantas mortas. Dos sintomas moderados foi subtraído

0,5 ponto e do sintoma severo foi adicionado 0,5 ponto. Usando este esquema a planta que tiver com necrose severa, murcha e cancro receberá o IDRS de 4,5 e a planta com necrose moderada, murcha e cancro receberá o IDRS de 1,5. Utilizou-se a média do IDRS durante a avaliação da severidade.

2.3. Efeito de dois extratos aquosos e uma seiva vegetal *in vivo* sobre a murcha bacteriana

A inoculação foi feita por meio do corte das raízes com tesoura e imersão em suspensão bacteriana por 5 minutos. Os procedimentos de aplicação dos extratos via foliar e via solo foram os mesmos utilizados na pinta bacteriana, e as plantas de tomate foram submetidas aos mesmos tratamentos com exceção do oxiclreto de cobre que não foi utilizado neste experimento (item 2.1).

A avaliação teve como objetivo a incidência, por isso foi quantificada a porcentagem de plantas doentes ou partes de plantas doentes na população (Madden *et al.*, 2007). A incidência foi registrada a partir da primeira ocorrência de planta com sintomas de murcha, de modo a acompanhar o progresso da doença ao longo do tempo. Todas as plantas com murcha irreversível foram submetidas a testes de exsudação em copo com água e posteriormente levadas ao laboratório de Bacteriologia e Patologia de Sementes da UFV, onde foi feito o reisolamento do patógeno. Foi calculado o progresso da doença de maneira cumulativa, as análises foram realizadas com o programa SAS System versão 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Murcha bacteriana

No primeiro experimento realizado em casa de vegetação, a doença ocorreu somente nas testemunhas T7 (água destilada + Tween 80 pulverizados na parte aérea) e T8 (plantas regadas com água destilada). Os sintomas de murcha surgiram do 7º ao 15º dia após a inoculação (DAI). As avaliações continuaram até o 45ºDAI e o número de plantas mortas foi 6 e 17 nos tratamentos 7 e 8 respectivamente. Nesse mesmo período, nas demais plantas não ocorreram os sintomas da doença. No segundo experimento não houve diferença significativa no avanço da doença, entre os tratamentos (Figuras 2 e 3). O fator temperatura pode ter interferido nos resultados, pois, durante o primeiro experimento as plantas foram mantidas a 30°C, enquanto no segundo experimento a temperatura variou entre 30-35°C. De acordo com Lopes (2005), a temperatura elevada e a alta umidade do solo são fatores determinantes das epidemias severas da murcha bacteriana em tomateiro. A alta temperatura também pode ter influenciado na volatilização dos compostos presentes nos extratos, os quais não causaram, portanto, qualquer efeito nas plantas tratadas. Devem ser realizados novos estudos que avaliem a eficiência destes extratos quando utilizados em diversas temperaturas.

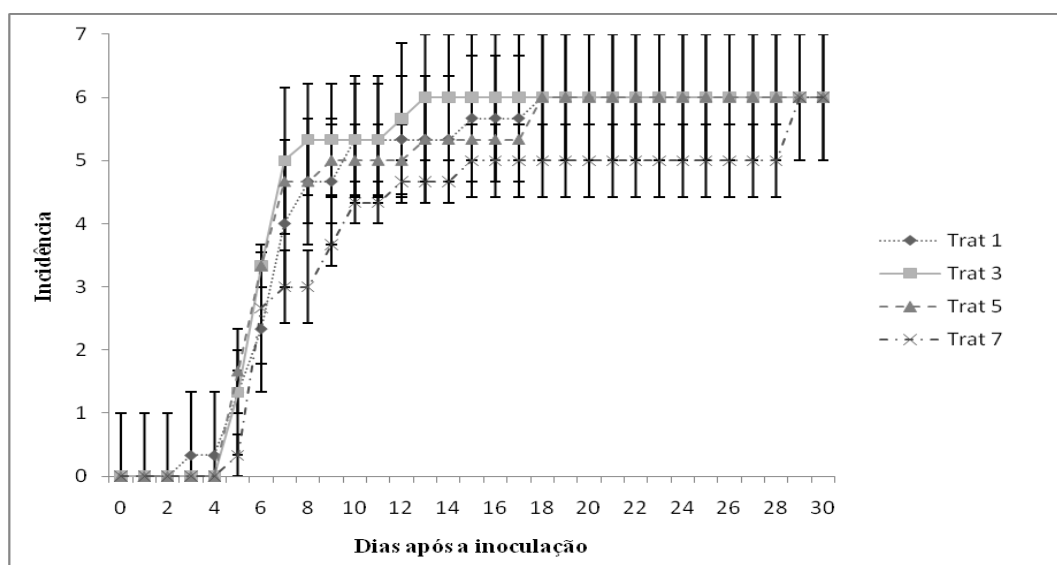


Figura 2- Progresso da murcha bacteriana (*R. solanacearum*) em tomatesiros (*Solanum lycopersicum*) tratados com extratos de plantas via foliar (Trat 1, Trat 3 e Trat 5) e não tratados (Trat 7), ao longo de 30 dias. Barras verticais representam o erro padrão da média.

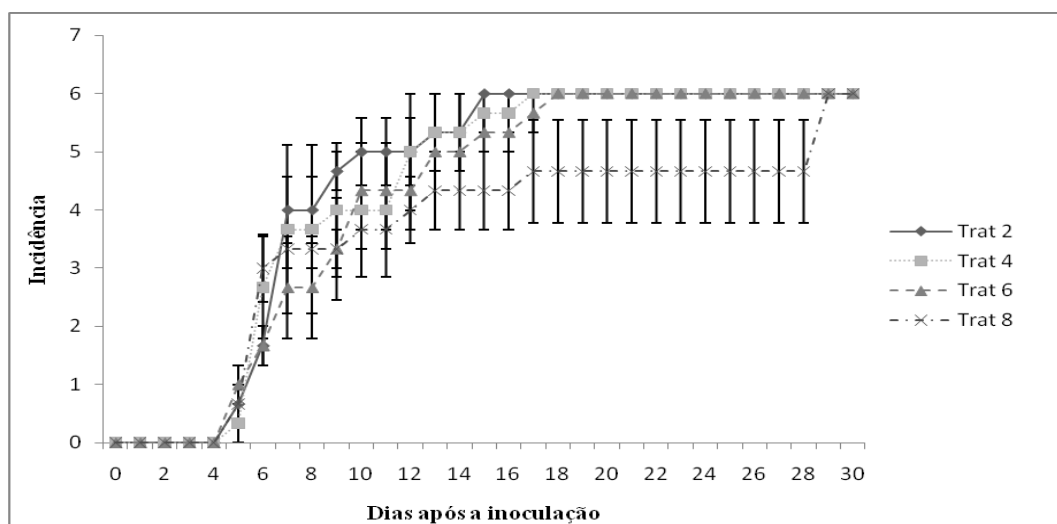


Figura 3- Progresso da murcha bacteriana (*R. solanacearum*) em tomatesiros (*Solanum lycopersicum*) tratados com extratos de plantas no solo (Trat 2, Trat 4 e Trat 6) e não tratados (Trat 8), ao longo de 30 dias. Barras verticais representam o erro padrão da média.

Pinta bacteriana

No primeiro experimento realizado em casa de vegetação, entre as plantas tratadas com extratos não houve diferença significativa em vista de ocorrer à lavagem do inóculo durante a permanência das plantas na câmara de nevoeiro. No segundo experimento, a aspersão na câmara de nevoeiro foi controlada evitando a lavagem do

inóculo. Durante o dia, a cada 1 hora, as plantas recebiam aspersão com a duração de 7 segundos garantindo assim a umidade necessária à penetração da bactéria. Os sintomas foram observados 14 dias após a inoculação, realizando-se, então, a contagem do número de lesões nas folhas e no caule. Não houve efeito significativo do local de aplicação ($P = 0,67$) e nem da interação entre tratamento/local ($P = 0,056$), entretanto houve efeito ($P < 0,001$) de tratamento (Tabela 1). Por não haver diferença no modo de aplicação dos extratos, foram considerados 4 tratamentos: tratamento 1 (AM 15 - solo e pulverizado), tratamento 2 (AM3 - solo e pulverizado), tratamento 3 (AM16 - solo e pulverizado) e tratamento 4 (água destilada - solo e pulverizada).

Tabela 1- Severidade da pinta bacteriana em tomateiros (*Solanum lycopersicum*), tratados com extratos de plantas (1, 2 e 3), e não tratados (4).

Tratamento	Média (nº de pintas)	Log _e (nº de pintas)
4	860	6.09 a
2	48.50	2.92 b
3	25.37	2.12 b
1	22.62	2.02 b

As médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,01$).

Nas plantas em que se pulverizou o oxiclureto de cobre o n° médio de lesões foi 1661,75. A dosagem utilizada foi de 6g/L, acima da recomendada (2g/L), demonstrando que este produto não é eficiente no controle desta bacteriose do tomateiro. Segundo Romeiro (2005), fungicidas protetores (cúpricos e tiocarbamatos) e antibióticos são químicos pouco persistentes, não sistêmicos e de baixa absorção pelas plantas, causando controle insatisfatório de fitobacterioses. Também, a resistência do isolado bacteriano ao cobre pode ser apontada como uma das causas da baixa eficiência do controle, porém são necessários ensaios *in vitro* que confirmem esta hipótese.

Uma maneira possível de o extrato ter reduzido a intensidade da doença é a indução de resistência. Os agentes indutores não atuam diretamente controlando o patógeno ou transformando-se em algum agente antimicrobiano, mas sim sensibilizando as plantas ao ativarem seus mecanismos de defesa em resposta a presença do patógeno,

podendo ser efetiva contra diversos patógenos incluindo vírus, bactérias, e fungos (Conrath *et al.*, 2002; Baysal *et al.*, 2003; Bonaldo *et al.*, 2005; Ryals *et al.*, 1996). No entanto, a confirmação desses resultados implica na necessidade de experimentos adicionais, como a determinação da atividade de enzimas indicadoras do estado de indução, verificando se há restrição do patógeno nos tecidos da planta, ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno e outros critérios que possam ser adotados para a confirmação do estado de indução (Romeiro, 2007).

Indutores de resistência vêm sendo produzidos e comercializados no controle de doenças das plantas. O indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) foi testado no controle da pinta bacteriana do tomateiro e reduziu a incidência da doença tanto nas folhas quanto nos frutos (Louws *et al.*, 2001). Portanto, a determinação das propriedades de compostos secundários presentes nas plantas medicinais com características eliciadoras ou antimicrobianas pode contribuir com sua utilização como medida alternativa e complementar no controle de doenças bacterianas de plantas.

Cancro bacteriano

No experimento realizado em casa de vegetação sobre o cancro bacteriano, o EA AM15, regado no solo, promoveu o controle da doença durante o período de avaliação (30 dias) (Figura 4). O tratamento 3 (AM3 pulverizado na parte aérea) quando comparado com os demais foi o de menor eficiência, seguido dos tratamentos 5 (AM16 pulverizado na parte aérea) e 9 (oxicloreto de cobre) (Figura 4). O método de inoculação adotado no presente trabalho foi escolhido pelo fato de potencialmente permitir a ocorrência de todos os sintomas da doença (Francis & Kabelka, 2001). Entretanto, foi avaliado somente o sintoma de murcha, pois os demais sintomas causados pela doença dependeriam da condução das plantas até o final do ciclo.

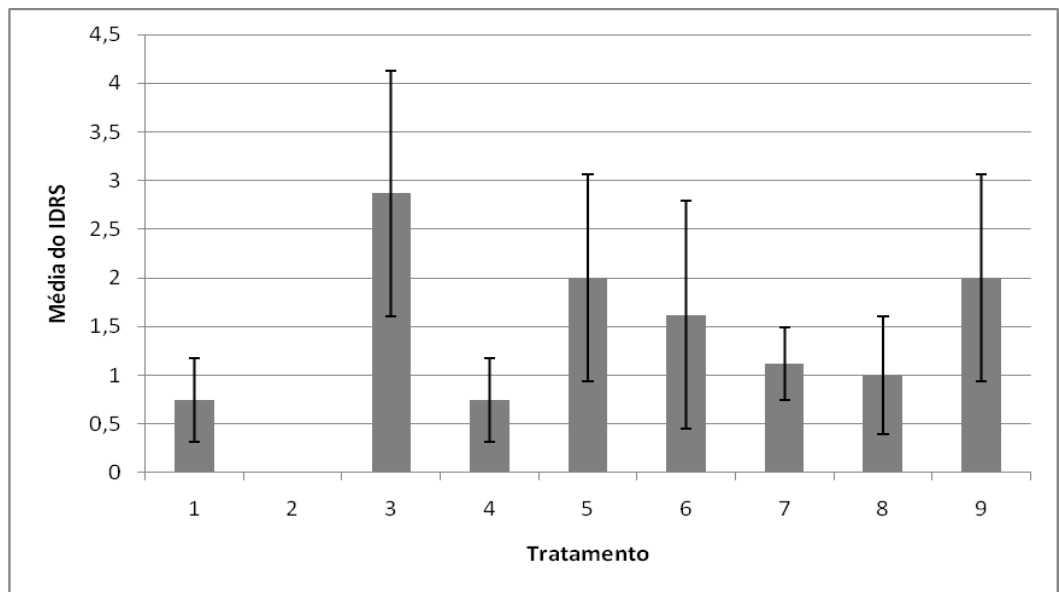


Figura 4- Severidade do cancro bacteriano do tomateiro após tratamento com diferentes extratos de plantas da região Amazônica. Avaliação realizada por meio das médias do Individual Disease Rating Scores (IDRS), utilizando escala descritiva variando de 0 a 5. Barras verticais representam o erro padrão da média.

O oxiclreto de cobre também demonstrou baixa eficiência no controle do cancro bacteriano, provavelmente devido ao fato de ter ação fungicida protetora, não sistêmico e de baixa absorção pelas plantas. Em experimento realizado por Kronka (2004), foram testados os produtos combinados: ASM + mancozeb e ASM + oxiclreto de cobre, no controle do cancro bacteriano. Entretanto, o tratamento com ASM isoladamente, foi melhor que os produtos tradicionalmente empregados na redução da doença. Em parte, a baixa eficiência desses produtos também pode ser explicada pela resistência de isolados bacterianos a esses princípios ativos.

Diversos produtos naturais, entre os quais extratos de plantas medicinais, têm o potencial de uso no manejo de doenças em plantas, tanto por sua atividade antimicrobiana direta quanto indireta (Stangarlin, *et al.*, 1999; Fiori *et al.*, 2000). O Brasil atualmente ocupa a segunda posição na América Latina em área manejada organicamente, principalmente com hortaliças (Willer & Yussefi, 2005). Estes produtos

podem ser facilmente empregados no sistema de cultivo orgânico e, também, na agricultura familiar. No cultivo convencional do tomate, onde ocorre uma intensa utilização de insumos agrícolas, com alto risco de contaminação do ambiente, dos consumidores e dos agricultores (Drinkwater *et al.*, 1995), produtos naturais podem ser uma alternativa para o manejo de bacterioses de plantas. Portanto, a determinação da atividade biológica desses compostos é importante na identificação dos princípios ativos que tem atividade antimicrobiana ou características eliciadoras, o que permitiria a utilização no manejo de doenças bacterianas, minimizando o uso de agrotóxicos.

LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology. San Diego: Academic Press, 635p. 1997.
- BALA, S.K. & SUKUL, N.C. Systemic nematocidal effect of eugenol. Nematropica. 17: 219-222. 1987.
- BALBI-PEÑA, M.I., BECKER, A., STANGARLIN, J.R., FRANZENER, G., LOPES, M.C. & SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. Fitopatologia Brasileira 31:401-404. 2006.
- BAYSAL, O., SOYLU, E.M. & SOYLU, S. Induction of defence related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar- S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *C. michiganensis* ssp. *michiganensis*. Plant Pathology 52:747-753. 2003.
- BONALDO, S.M., PASCHOLATI, S.F. & ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: Cavalcanti, L.S., Di Piero, R.M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V. & Romeiro, R.S. (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. FEALQ. p. 11-28. 2005.
- CONRATH, U., PIETERSE, C.M.J. & MAUCH-MANI, B. Priming in plant pathogen interactions. Trends in Plant Science 7:210-216. 2002.
- DRINKWATER, L.E.; LETOURNEAU, D.K.; WORKNEH, F.; Van BRUGGEN, A.H.C.; SHENNAN, C. Fundamental differences between conventional and organic

- tomato agroecosystems in California. *Ecological Applications*, v.5, p.1098-1112, 1995.
- FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental, Campina Grande, v.2, p. 6-16. 1998.
- FRANCIS, D.M. & KABELKA, E. Resistance to Bacterial Canker in Tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA 407) and its Progeny Derived from Crosses to *L. esculentum*. *Plant. Dis.* 85: 1171-1176. 2001.
- FIORI, A. C. G. *et al.* Atividade de lecitinas sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. *Fitopatologia brasileira*, Brasília, v.25, p.373. 2000.
- KRONKA, A.Z. Cancro bacteriano do tomateiro: metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle (Tese de doutorado). Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2004.
- LOPES, E.A. Potencial de extratos aquosos e da incorporação ao solo de Mucuna Preta (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) para o controle de nematóides das galhas. (Tese de Mestrado). Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 2004.
- LOPES, C.A. & QUEZADO, A.M. Doenças Bacterianas. In: Doenças do tomateiro LOPES, C.A. & ÁVILA, A.C. Embrapa Hortaliças. Brasília, p. 55-67. 2005.
- LOUWS, F. J., WILSON, M., CAMPBELL, H. L., CUPPELS, D. A., JONES, J. B. SAHIN, F., and MILLER, S. A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*. 85: 481-488. 2001.

- MACHADO, E. C. & LAGÔA, A. M. M. A. Trocas gasosas e condutância estomática em três espécies de gramíneas. *Bragantia*, Campinas, 53 (2): 141-149. 1994.
- MADDEN, L.V., HUGHES, G., BOSCH, F,V,D. Measuring plant diseases. In: The study of plant disease epidemics. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota U.S.A. 2007. P 1-10.
- MARSHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. 2. ed. London: Academic Press. p.889 1995.
- PRADHANANG, P.M., MOMOL, M.T. & OLSON, S.M. Effects of plant essential oils on *R. solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Dis.* 87: 423-427. 2003.
- ROMEIRO, R. S. Bactérias fitopatogênicas. 2^a ed. Viçosa: Editora UFV, 417p. 2005.
- ROMEIRO, R. S. Controle biológico de doenças de plantas- fundamentos. Viçosa: Editora UFV, 269p. 2007.
- RYALS, J.A., NEUENSCHWANDER, U.H., WILLITS, M.G., MOLINA, A., STEINER, H. & HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1809-1819. 1996.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S., STANGARLIN, J. R. & PASCHOLATI S. F. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. *Fitopatologia brasileira* 22:346. 1997. (Resumo).

- STANGARLIN, J. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S. & NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 11:16- 21. 1999.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. Secondary Metabolites and Plant Defense and Water balance of plants. In: TAIZ, I. ZEIGER, E. *Plant Physiology*. California: The Benjamin/Cummings publishing Company, Inc. 1991.
- WILLER, H. & YUSSEFI, M. The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends. Bonn. International Federation of Organic Movement (IFOAM) & Research Institute of Organic Agriculture FiBL. 2005.