

Efeito Inibitório de Extratos Vegetais Sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Agente Etiológico do Cancro Bacteriano do Tomateiro.

Inhibitory Effect of Plant Extracts on Clavibacter michiganensis Subsp. michiganensis-the Causal Agent Bacterial Canker of Tomato

RIBEIRO, Luiz Fernando Caldeira. Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus Universitário de Alta Floresta, luizribeiro@unemat.br; HEMKEMEIER, Simone. Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus Universitário de Alta Floresta; SANTOS, Cleidiany Silva. Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus Universitário de Alta Floresta; MULLER, Kelly. Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus Universitário de Alta Floresta

Resumo

Extratos aquosos foram obtidos a partir de bulbilhos de alho e cebola, folhas de hortelã e frutos de pimenta. Após a incorporação destes extratos, obtendo-se concentrações de 1,0%, 5,0%, 10,0%, 20,0% e 50,0%, foi avaliado o crescimento bacteriano de isolado de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente etiológico do cancro bacteriano do tomateiro. Para os testes *in vitro* foi utilizado o método de incorporação de extratos vegetais ao meio de cultura BDA, posteriormente realizada a contagem de unidades formadoras de colônia. O extrato aquoso de alho, nas concentrações de 5,0% a 50,0%, promoveu uma redução no crescimento da referida bactéria, não apresentando resultado significativo na concentração de 1,0%. As concentrações 50,0% e 20,0% dos extratos de alho e pimenta, respectivamente, não diferiram estatisticamente do controle com tetraciclina. Testes “*in vivo*” devem ser realizados para uma recomendação dos extratos para o controle alternativo do agente causal do cancro bacteriano do tomateiro.

Palavras-chave: Unidades Formadoras de Colônias, *Lycopersicon esculentum*, extratos aquosos, controle alternativo.

Abstract

Aqueous extracts were obtained from bulbils of garlic and onion, mint leaves and to fruits of pepper. After incorporation of these extracts, resulting in concentrations of 1.0%, 5.0%, 10.0%, 20.0% and 50.0%, was evaluated for bacterial growth isolated from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the etiologic agent of bacterial canker of tomato. For *in vitro* tests we used the method of incorporation of plant extracts in culture medium PDA then performed the counting of colony-forming units. The aqueous extract of garlic, in concentrations of 5.0% to 50.0%, promoted a reduction in the growth of the bacteria, showed no significant result in the concentration of 1.0%. Concentrations 50.0% and 20.0% of extracts of garlic and pepper did not differ statistically from the control with tetracycline. “*In vivo*” tests must be made to a recommendation of the extracts for the alternative control causal agent of bacterial canker of tomato.

Keywords: Colony-forming units, *Lycopersicon esculentum*, plant extracts, alternative control.

Introdução

As doenças de plantas são responsáveis por consideráveis perdas para as culturas de importância econômica, encontrando-se, entre elas, as doenças da cultura do tomateiro. Para reduzir os prejuízos, métodos físicos, químicos e biológicos vêm sendo empregados, visando o controle deste grupo de doenças (SITTON e PATTERSON, 1992). Os métodos físicos e biológicos se constituem em alternativas viáveis e desejáveis em relação ao químico tradicional, principalmente em função de não deixarem resíduos tóxicos nos frutos tratados. Ainda, o emprego dos chamados fungicidas naturais aparece como mais uma opção ao uso dos fungicidas sintéticos, em termos de eficiência

de controle (WILSON e WISNIEWSKI, 1994). Devido a essa necessidade de preservar o meio ambiente e diminuir os riscos para os trabalhadores, os agricultores estão preferindo utilizar métodos de controle alternativo para o controle de pragas e doença (SCHWAN-ESTRADA, 2004). Para doenças de etiologia bacteriana, o controle é difícil e oneroso, inclusive o controle químico. Dessa forma a prevenção é a melhor maneira de evitar perdas por doenças bacterianas e como alternativa de controle tem-se a utilização de diferentes extratos naturais, pois evita contaminações do ambiente e são de fácil preparo e utilização.

Dentre os extratos mais pesquisados encontra-se aquele obtido de alho (*Allium sativum* L.). O seu efeito inibitório tem sido demonstrado para uma extensa gama de fungos, envolvendo não só patógenos de pós-colheita, mas também patógenos foliares e de solo (BARROS et al., 1995). Além do alho, extratos originários de hortelã (*Mentha piperita*) e pimenta (*Capsicum* spp) também têm evidenciado propriedades antifúngicas e antibacterianas, demonstrando potencial de controle para patógenos de plantas (BASTOS, 1992; MERA, 2008; BOITA, 2008).

O cancro é uma doença que está amplamente distribuída pelo mundo, nos EUA, onde foi primeiramente descrita, no Canadá, Europa, Austrália, Nova Zelândia, África, China e América do Sul (RODRÍGUEZ et al., 1997). Segundo Filgueira (2003), o cancro causado pela bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* é a principal bacteriose do tomateiro. O sucesso do controle do cancro bacteriano do tomateiro está fundamentado na adoção de um conjunto de medidas de caráter preventivo, uma vez que não existe um produto químico que controle eficientemente a doença, depois que esta se instalou na lavoura (KRONKA, 2004).

Visando a adoção de medidas eficientes no controle do cancro bacteriano, o presente trabalho foi desenvolvido tendo como objetivo avaliar “*in vitro*” o efeito de diferentes extratos aquosos sobre o crescimento de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, como uma possível alternativa para o controle dessa doença.

Metodologia

O experimento foi realizado no ano de 2008, no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UNEMAT (Universidade do Estado de Mato Grosso), localizada na MT 208, Km 143, no município de Alta Floresta/MT. Os isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al foram cedidos pelo Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, localizada em Piracicaba, São Paulo. Os isolados foram cultivados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar. Para a preservação, os isolados foram cultivados em meio BDA, em tubos de ensaios, durante três dias a 20°C ± 2°C. Após esse período, as culturas bacterianas foram cobertas com óleo mineral esterilizado, até uma altura de aproximadamente dois centímetros acima do meio de cultura. Os tubos foram fechados com tampões de algodão, vedados com filme plástico e armazenados, na posição vertical, à temperatura ambiente.

Para a obtenção dos extratos vegetais, foram utilizadas folhas de hortelã e mamona, bulbilhos de alho e frutos de pimenta. Para extração, foram pesados 5g de material vegetal, o qual foi triturado em 50ml de água destilada esterilizada, durante 10 minutos, em um processador. A seguir o material foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº1) e, posteriormente, em membrana filtrante de porosidade de 0,45mm. Os extratos aquosos foram utilizados imediatamente após sua obtenção.

Os diferentes extratos, individualmente, foram adicionados ao meio de BDA de modo a se obter concentrações de 1%, 5%, 10%, 20% e 50%, onde cada concentração representou um tratamento. O tratamento positivo, representado pelo controle químico com tetraciclina utilizou-se as mesmas percentagens. Placas de petri contendo somente BDA serviram como testemunhas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com sete tratamentos e com cinco repetições. A bactéria foi repicada pipetando-se uma alíquota de 0,1 mL de suspensão contendo 10⁸

UFC mL⁻¹, sendo então incubada a 25°C, por 48 h, sob agitação. A avaliação do número de bactérias foi em espectrofotômetro com comprimento de onda de 580 nm.

A curva de crescimento bacteriano foi obtida pelo método de determinação da concentração do inoculo pela contagem em placas de Petri (MARIANO e ASSIS, 2000). Foram ajustadas suspensões bacterianas (em solução salina – NaCl 0,85%) para obtenção de leituras de absorbância a 580 nm de 2,4; 2,0; 1,6; 1,2; 0,8 e 0,4. Para as absorbâncias 2,4; 2,0 e 1,6 foram realizadas diluições de até 10⁸ e, para as demais absorbâncias diluições de até 10⁷, tendo sido plaqueados 100 mL das três últimas diluições no meio BDA. O cálculo da concentração da suspensão foi efetuado com base no número de unidades formadoras de colônias (UFC). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey (p<0,05) para comparação das médias, com o auxílio do software SISVAR.

Resultados e discussões

Todos os extratos testados demonstraram propriedades antibacterianas, sendo que somente o alho na concentração de 1% apresentou um número elevado de UFC, sendo acima do número apresentado na testemunha (32 e 25 UFC respectivamente). Comparando todos os extratos entre si e com a tetraciclina, verificou-se que a tetraciclina, nas concentrações de 50% e 20%, foram as mais eficientes, tendo total controle, (0,0 UFC cada), mas não diferiram estatisticamente do extrato de pimenta dedo-de-moça e alho, que nas concentrações de 50% e 20%, apresentaram uma eficiência foi de 6,81%. A eficiência dos controles avaliados está correlacionada significativamente ($R^2 = 0.9734$ e 0.9604), respectivamente para os controles de pimenta e alho. Tendo assim como alternativa viável, a utilização de extratos naturais de pimenta dedo-de-moça e alho, nas concentrações de 50% e 20%, substituindo o controle químico, garantindo uma menor degradação do meio ambiente nos sistemas agrícolas.

Na literatura há vários trabalhos que comprovam os efeitos antibacterianos de extratos vegetais, principalmente do alho. Neste trabalho é reforçada esta sua propriedade, juntamente com a demonstração da atividade de outros extratos como o de cebola, pimenta e hortelã. Sendo que a hortelã, como mostra Boita (2008), em seu trabalho não apresentou resultados satisfatórios no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflora*, já no controle de UFC de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, do presente trabalho pode-se notar que apresentou controle superior ao extrato de cebola e algumas concentrações de tetraciclina, como na concentração de 5% de hortelã e pimenta dedo-de-moça, que apresentou resultado superior a mesma concentração de tetraciclina, que pode ser observado na Tabela 1, notando-se que a pimenta dedo-de-moça na concentração de 1% apresentou a metade do número de unidades formadoras de colônias em relação a tetraciclina na mesma concentração de 1%. O efeito tóxico do alho sobre o crescimento de bactérias fitopatogênicas tem sido demonstrado em outros trabalhos. Boita, (2008), demonstra que o tratamento com extrato aquoso de alho apresentou eficiência no controle, “*in vitro*”, do número de colônia formadas de *Xanthomonas campestris* pv *passiflora*, nas concentrações de 1,0 e 10%.

Resumos do VI CBA e II CLAA

TABELA 1. Efeito de diversos extratos vegetais incorporados em diversas concentrações em BDA, sobre o crescimento *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* medido através das unidades formadoras de colônia com 1 dia de idade.

	Concentração em Porcentagem					
	1	5	10	20	50	Testemunha
Alho	32 f	16 d	09 b	03 a	03 a	44 e
Cebola	18 d	17 d	13 c	12 c	11 c	44 e
Hortelã	17 d	10 b	08 b	07 b	07 b	44 e
Pimenta Dedo de moça	08 b	07 b	07 b	03 a	03 a	44 e
Tetraciclina	16 d	14 c	07 b	00 a	00 a	44 e

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey (DMS = 0,2851). Valor do Coeficiente de Variação = 3,66 %.

Conclusões

O extrato aquoso de hortelã apresentou resultado significativo no controle da bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Apresentando resultados superiores aos extratos de cebola. O extrato aquoso de alho, dentro dos limites de concentrações de 5% a 50%, promoveu uma redução efetiva na unidade formadora de colônia da referida bactéria, somente a concentração de 1% reagiu inversamente aumentando o número de UFC, apresentando-se maior que a testemunha. Os extratos aquosos de cebola e pimenta dedo-de-moça inibiram significativamente a reprodução bacteriana em todas as concentrações testadas.

Referências

BARROS, S.T.; OLIVEIRA, N.T.; MAIA, L.C. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial de *Curvularia* spp e *Alternaria* spp. *Summa Phytopathologica*, Jaguariauna, v. 21, p. 168-170, 1995.

BASTOS, C.N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 17, p. 454-457, 1992.

BOITA, D.C. *Efeito inibitório de extratos vegetais aquosos sobre Xanthomonas campestris pv. passiflorae – agente causal da mancha bacteriana do maracujazeiro*. 2008. 40 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Bacharelado em Agronomia) – Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta. 2008.

FILGUEIRA, A.F.R. *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003.

KRONKA, A.Z. *Cancro bacteriano no tomateiro: metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle*. 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MERA, L.P. *Controle “in vitro” utilizando extratos vegetais e tetraciclina no controle de Xanthomonas campestris pv. passiflorae*. 2008. 35 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Bacharelado em Agronomia) – Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta. 2008.

MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.) *Manual de Práticas em Fitobacteriologia*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000b. p. 49-52.

Resumos do VI CBA e II CLAA

RODRÍGUEZ, R.R.; TABARES RODRÍGUEZ, J.M., SAN JUAN J.A.M. *Cultivo moderno del tomate*. Mundi-Prensa Libros, 1997.

SCHWAN-ESTRADA, K.; STANGARLIN, J.; CRUZ, M. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Revista Floresta*, Curitiba, v. 30, n. 12. p. 08-12, 2004.

SITTON, J.W.; PATTERSON, M.E. Effect of highcarbon dioxide and low oxigen controlled atmospheres on postharvest decays of apples. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 76, p. 992-995, 1992.

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. *Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice*. Boca Raton: CRC Press, 1994. 465p.