



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

## **TESE DE DOUTORADO**

# **Óleos essenciais e silício para controle da murcha bacteriana do tomateiro**

**Meridiana Araújo Gonçalves Lima**

**RECIFE - PE  
FEVEREIRO – 2016**

**MERIDIANA ARAÚJO GONÇALVES LIMA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS E SILÍCIO PARA CONTROLE DA MURCHA BACTERIANA  
DO TOMATEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientadora: Rosa de Lima Ramos Mariano

Co-orientadora: Elineide Barbosa de Souza

Co-orientador: Leonardo de Sousa Cavalcanti

Co-orientadora: Ana Rosa Peixoto

**RECIFE - PE  
FEVEREIRO – 2016**

Ficha catalográfica

L732o Lima, Meridiana Araujo Gonçalves  
Óleos essenciais e silício para o controle da murcha bacteriana do tomateiro / Meridiana Araujo Gonçalves Lima. – Recife, 2016.  
89 f. : il.

Orientadora: Rosa de Lima Ramos Mariano.  
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife,  
2016.

Referências.

1. Solanum lycopersicum 2. Ralstonia solanacearum  
3. Biofumigação 4. Produção de mudas 5. Óleo de cravo  
6. Eugenol I. Mariano, Rosa de Lima Ramos, orientadora II.

Título

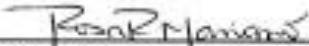
CDD 632

**ÓLEOS ESSENCIAIS E SILÍCIO PARA CONTROLE DA MURCHA BACTERIANA  
DO TOMATEIRO**

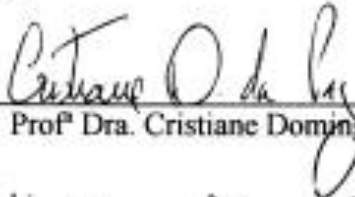
**MERIDIANA ARAÚJO GONÇALVES LIMA**

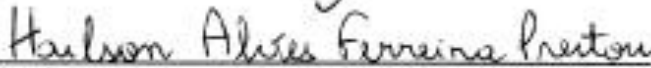
Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 29/02/2016.

**ORIENTADORA:**

  
Profª Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE)

**EXAMINADORES:**

  
Profª Dra. Cristiane Domingos da Paz (UNEB)

  
Profª Dr. Hailson Alves Ferreira Preston (UFRN)

  
Profª Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

  
Profª Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE)

**RECIFE - PE  
FEVEREIRO - 2016**

A Glaydson, meu amado esposo,  
pelo incentivo, amor, dedicação,  
companheirismo e acima de tudo  
por compreender a minha ausência  
em diversos momentos,

*Ofereço*

À minha família pelo amor, apoio,  
incentivo e confiança em todos os  
momentos da minha vida,

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por seu imenso amor, pela saúde, força e resiliência concedidas a mim durante o decorrer desta trajetória;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela formação oferecida através do curso de Doutorado em Fitopatologia e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado;

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa de Lima Ramos Mariano, pela orientação e incansável colaboração e incentivo;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Rosa Peixoto (UNEB) e ao Prof. Leonardo de Souza Cavalcanti (UNIVASF), pela co-orientação, por atenciosamente me receber e permitir que desenvolvesse meus experimentos nos respectivos Laboratórios de Fitopatologia e Bioquímica Vegetal;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Domingues da Paz (UNEB), pela disponibilidade e ajuda durante os experimentos;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elineide Barbosa de Souza e ao Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama, pela co-orientação e ajuda;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sônia Maria Alves de Oliveira, pelos ensinamentos e conversas alegres compartilhadas;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelo conhecimento transmitido e aos funcionários do Departamento de Fitossanidade: Darci Martins, Roberto Luiz e Romildo Angeiras pela presteza, carinho e amizade ao longo do curso;

Às minhas amadas amigas Greecy, Myrzânia, Edilaine, Kátia, Mirtis, Liliana, Walkíria, Christiane e Monique, minha imensa gratidão pelo companheirismo de todos os momentos dessa trajetória e toda força recebida;

À Dona Neuma e Seu Bernadino, que me adotaram como uma filha e à Tia Lucilia, pelo seu imenso carinho e cuidado nos momentos de cansaço e desânimo;

Aos meus “irmãos postiços” Ivanildo, Virgínia, Marcelo Campos, Edilaine Pereira e Silvana pela valiosa amizade, dedicação e colaboração nos trabalhos;

Aos meus sogros Dona Lindaura e Seu Manoel e aos meus cunhados, em especial Antônio Jean, pela ajuda, compreensão e apoio nos momentos de ausência;

Finalmente, a todos que, de uma forma ou de outra, participaram de momentos vividos nessa jornada.

## Sumário

	<b>Página</b>
AGRADECIMENTOS .....	V
RESUMO GERAL .....	IX
GENERAL ABSTRACT.....	XI
CAPÍTULO I.....	13
ÓLEOS ESSENCIAIS E SILÍCIO PARA CONTROLE DA MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO.....	
INTRODUÇÃO GERAL .....	14
A cultura do tomateiro.....	14
Murcha bacteriana: Importância da doença e do patógeno .....	15
Murcha bacteriana: Ciclo e manejo da doença.....	17
Óleos essenciais no controle da murcha bacteriana.....	19
Silício no controle de doenças de plantas .....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
CAPÍTULO II.....	29
Óleos Essenciais no Controle da Murcha Bacteriana do Tomateiro .....	30
Resumo .....	30
Introdução.....	31
Materiais e Métodos .....	33
Obtenção, cultivo e identificação do isolado bacteriano .....	33
Óleos essenciais.....	33
Sensibilidade in vitro de <i>R. solanacearum</i> aos óleos essenciais.....	34
Biofumigação do solo com óleos essenciais .....	34
População de <i>R. solanacearum</i> em solos biofumigados com óleos essenciais.....	35
Características químicas do solo biofumigado com óleos essenciais.....	36
Componentes de resistência à murcha bacteriana em plantas de tomateiro cultivadas em solo biofumigado com óleos essenciais.....	36
Crescimento das plantas de tomateiro cultivadas em solo biofumigado com óleos essenciais .....	37
Composição química do óleo essencial de cravo .....	37

Atividade bactericida e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial de cravo e seu componente bioativo (acetato de eugenol) sobre <i>R. solanacearum</i> .....	38
Efeito da biofumigação com óleo essencial de cravo e seu composto bioativo (acetato de eugenol), em solo infestado com <i>R. solanacearum</i> , sobre a população bacteriana, componentes de resistência à murcha bacteriana e crescimento das plantas de tomateiro ....	39
Análises estatísticas .....	39
Resultados.....	40
Sensibilidade in vitro de <i>R. solanacearum</i> aos óleos essenciais.....	40
População de <i>R. solanacearum</i> em solos biofumigados com óleos essenciais.....	40
Características químicas do solo biofumigado com os óleos essenciais .....	41
Componentes de resistência à murcha bacteriana em plantas de tomateiro cultivadas em solo biofumigado com óleos essenciais.....	41
Crescimento de plantas de tomateiro em solo biofumigado com óleos essenciais .....	41
Composição química do óleo essencial de cravo .....	42
Atividade bactericida e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial de cravo e seu componente bioativo (acetato de eugenol) sobre <i>R. solanacearum</i> .....	42
Efeito da biofumigação com óleo essencial de cravo e seu composto bioativo (acetato de eugenol), em solo infestado com <i>R. solanacearum</i> , sobre a população bacteriana, componentes de resistência à murcha bacteriana e crescimento das plantas de tomateiro ....	43
Discussão .....	43
Agradecimentos.....	46
Referências .....	47
CAPÍTULO III .....	58
Silício no manejo da murcha bacteriana em três variedades de tomateiro.....	59
Resumo .....	59
Introdução.....	60
Material e Métodos.....	62
Isolado, preparo do inóculo e infestação do solo.....	62
Silício no substrato para produção de mudas de tomateiro .....	63
Silício nas características químicas do substrato.....	64
Silício nos componentes de resistência à murcha bacteriana, crescimento de tomates e teores de Si nas plantas.....	65



Silício no índice reativo de clorofila.....	66
População de <i>R. solanacearum</i> nos tecidos de plantas de tomateiro tratadas com silício.....	66
Silício na atividade enzimática de plantas de tomateiro.....	67
Análise estatística .....	68
Resultados.....	68
Silício nas características químicas do substrato.....	68
Silício nos componentes de resistência à murcha bacteriana, crescimento de tomates e teores de Si nas plantas .....	69
População de <i>R. solanacearum</i> dos tecidos de plantas de tomateiro tratadas com silício.....	70
Silício na atividade enzimática das plantas de tomateiro .....	70
Discussão .....	70
Agradecimentos .....	74
Referências .....	74
CONCLUSÕES GERAIS .....	88

## RESUMO GERAL

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) é uma das doenças economicamente mais importantes em tomateiro. Os óleos essenciais de gengibre e melaleuca a 1%, alecrim a 0,50% e bergamota, capim limão, cravo, citronela, eucalipto, laranja doce palmarosa e sálvia a 0,14% (v/v) foram testados *in vitro* e pela biofumigação do solo infestado com *Rs*. Foram avaliados o crescimento *in vitro*, a população de *Rs* no solo antes e sete dias depois da biofumigação, os componentes de resistência à doença e o crescimento das plantas em tomateiros da cv. TY 2006, aos 15 dias após o transplântio. O óleo de cravo foi fracionado e seu constituinte químico majoritário foi comparado com o óleo essencial quanto a redução da doença e demais variáveis citadas anteriormente. No ensaio *in vitro*, os óleos de alecrim, capim limão, citronela, cravo, eucalipto e palmarosa inibiram completamente o crescimento de *Rs*. A população de *Rs* no solo foi reduzida pelos óleos de alecrim, cravo, capim limão, gengibre, melaleuca e palmarosa, destacando-se o cravo com redução de 42,3%. A biofumigação com o óleo de cravo reduziu a incidência, o índice de murcha bacteriana (IMB) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em 90,2; 97 e 98,8%, respectivamente e elevou o período de latência - PL<sub>50</sub> em 10 dias com relação a testemunha com Tween 20. Este óleo apresentou o eugenol como constituinte majoritário (87%), com os mesmos efeitos na redução dos componentes de resistência da doença. O óleo de cravo e o acetato de eugenol não reduziram a altura, biomassa fresca e seca das plantas. Em um segundo experimento, foi avaliado o efeito da suplementação do silício (Si) na produção de mudas de tomateiro das cultivares (cvs.) Santa Clara, TY 2006 e Yoshimatsu 4-11. As mudas foram produzidas em substrato sem silício (-Si) ou com 3 g de silicato de cálcio/kg de substrato (+Si) e transplantadas para solo com *Rs*. Aos 15 dias de cultivo, foram avaliados os componentes de resistência à doença; o crescimento das plantas, medindo-se a altura e o peso da biomassa fresca e seca, o índice relativo de clorofila; o conteúdo de Si na planta; a

população de *Rs* no caule; e as atividades enzimáticas de fenilalanina amônia-liases (FAL),  $\beta$ -1,3 glucanases (GLU) e peroxidases (POX). A suplementação com Si nas cvs. Santa Clara e TY 2006 promoveu redução da doença avaliada pela severidade (33,2 e 42%), AACPD (23,1 e 19,2%) e IMB (21,7 e 10%), respectivamente. A suplementação com Si no substrato não afetou de forma significativa o crescimento das plantas, o índice reativo de clorofila, o acúmulo de Si nos tecidos das plantas e a população de *Rs* nos tecidos do caule. Foi evidenciada maior atividade enzimática de FAL e GLU nas plantas tratadas (+Si). Desta forma, a biofumigação do solo com o óleo de cravo a 0,14 % e a produção de mudas em substrato tratado com Si têm potencial como medidas a serem utilizadas no manejo da murcha bacteriana em tomateiro.

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum*, *Ralstonia solanacearum*, biofumigação, produção de mudas, óleo de cravo, eugenol

## GENERAL ABSTRACT

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) is one of the most important tomato diseases in Brazil. The effectiveness of ginger and melaleuca at 1%, rosemary at 0.50% and bergamot, lemongrass, clove, citronella, eucalyptus, sweet orange, palmrose and sage at 0.14% (v/v) essential oils was evaluated *in vitro* and via biofumigation of the soil infested with *Rs*. It was analyzed the *in vitro* growth; the population of *Rs* in soil before and seven days after biofumigation; and the components of resistance to disease and the growth of tomato plants cv. TY 2006, 15 days after transplanting. The clove oil was fractioned and its major chemical component was compared with the essential oil in relation to the variables already cited. The *in vitro* growth of *Rs* was reduced by 100% with rosemary, lemongrass, citronella, clove, eucalyptus and palmrose oils. The population of *Rs* in soil was reduced by rosemary, clove, lemongrass, ginger, melaleuca and palmrose oils, with emphases for clove oil, which reduced *Rs* populations by 42.3%. The biofumigation with clove oil reduced the disease incidence, bacterial wilt index (BWI), and area under the disease curve progress (AUDPC) by 90.2, 97 and 98.8%, respectively and elevated the latent period by 10 days compared as the control with tween 20. The eugenol was the major constituent (87%) of the clove oil showing the same reduction effects of the components of disease resistance. The clove oil and the eugenol acetate did not reduce the height, and the fresh and dry biomass of plants. In a second experiment, it was also evaluated the effect of silicon (Si) supplementation on the production of tomato transplants cultivars (cvs.) Santa Clara, TY 2006 and Yoshimatsu 4-11. The transplants were produced in substrate without Si (-Si) or with 3 g of calcium silicate de calcium/kg of substrate (+Si) and transplanted to *Rs* infected soil. After 15 days of growing it was evaluated the resistance components; the plant growth by measuring height, and the fresh and dry biomass of plants; the chlorophyll index; the Si content in plant tissues; the *Rs* population in stem base; and the enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyases (PAL),  $\beta$ -1,3 glucanases (GLU) and peroxidases (POX). The Si supplementation on cvs.

Santa Clara and TY 2006 reduced severity (33.2 and 42%), AUDPC (23.1 and 19.2%) and BWI (21.7 and 10%), respectively. The Si supplementation in the substrate did not affect plant growth, the chlorophyll index; the Si content in plant tissues and the *Rs* population in stem. Higher activities of PAL and GLU were evidenced on +Si plants. Therefore, the soil biofumigation with clove oil at 0.14% and the production of tomato transplants in substrate with Si have the potential to be integrated in the bacterial wilt management.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, *Ralstonia solanacearum*, biofumigation, transplant production, clove oil, eugenol

## **CAPÍTULO I**

---

### **Introdução Geral**

## ÓLEOS ESSENCIAIS E SILÍCIO PARA CONTROLE DA MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

### INTRODUÇÃO GERAL

#### A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é cultivado praticamente em todo o mundo. A produção mundial de tomate está em torno de 163.434.041 toneladas, sendo os maiores produtores China, Estados Unidos, Índia, Turquia e Egito, com destaque para a China, que produz em média 29.231.128 milhões t/ano (FAO, 2016). No Brasil, é considerada a espécie mais importante do grupo das hortaliças, tanto sob o ponto de vista econômico quanto social, pelo volume de produção e geração de empregos (MACIEL et al., 2016).

Atualmente, o Brasil produz mais de 4 milhões de toneladas de tomate por ano, com uma área plantada de 62.782 hectares, ficando em primeiro lugar em volume produzido na América do Sul (FAO, 2016). O tomateiro é cultivado em escala comercial em todas as regiões do Brasil, sendo os principais estados produtores Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia, com 1.310.218, 781.000, 486.311, 207.424 e 288.477 t/ano, respectivamente (IBGE, 2015).

Na região Nordeste, o cultivo do tomateiro é feito basicamente em oito estados: Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe. A Bahia destaca-se com cerca de 288.477 t/ano. Pernambuco é o segundo maior produtor de tomate na região, com produção média de 128.881 t/ano, representando 22% da produção do Nordeste. Em Pernambuco, o cultivo concentra-se principalmente nos municípios de Belém do São Francisco, Ibimirim, Inajá, Floresta, Pesqueira, Petrolândia, São José do Belmonte, Bezerros, Cabrobó, Custodia e Garanhuns (IBGE, 2015).

Os altos índices de produção e a grande extensão de área plantada no mundo são justificados pelo fato de que o tomate está entre as hortaliças mais consumidas, sendo uma fonte de vitaminas A e C e de sais minerais como potássio e magnésio (MELO et al., 2014). Além disso, constitui uma das principais fontes de licopeno, antioxidante essencial para manutenção da saúde humana (SILVA et al., 2010).

O tomateiro pertence à família das solanáceas, sendo originário dos países andinos, desde o norte do Chile até a Colômbia. Esta solanácea é uma herbácea de caule flexível, piloso, com vasta ramificação lateral. A sua arquitetura, pode ser modificada pela poda, que caracteriza dois tipos de hábitos de crescimento. O tipo indeterminado é tutorado e podado, de grande ocorrência na maioria das cultivares destinadas à produção de frutos de mesa, enquanto o tipo determinado destina-se à agroindústria, onde as cultivares são adaptadas ao cultivo rasteiro (FILGUEIRA, 2008).

O cultivo do tomateiro, embora amplamente difundido e de grande importância no agronegócio, possui limitações, pois a planta é suscetível a uma gama considerável de patógenos, sendo as bactérias fitopatogênicas responsáveis por grandes prejuízos (PEIXOTO, 1997). Dentre estas, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., agente etiológico da murcha bacteriana, pode causar de 10 a 100% de perdas na produção brasileira de tomate, (LOPES; SANTOS, 1994).

### **Murcha bacteriana: Importância da doença e do patógeno**

A murcha bacteriana é uma das fitobacterioses mais importantes e prejudiciais à diversos cultivos, no Brasil e no mundo. Esta importância deve-se ao difícil manejo, relacionado, entre outros fatores, à ampla variabilidade genética da bactéria (FEGAN; PRIOR, 2005).

*R. solanacearum* distribuiu-se mundialmente nas regiões de clima tropical, subtropical e temperado e somente ainda não foi encontrada no continente Antártico (GROVER et al., 2006; WICKER et al., 2007). A murcha bacteriana é um fator limitante ao cultivo de solanáceas, particularmente em áreas de clima úmido, com altitudes baixa a média, em regiões tropicais e subtropicais (HAYWARD, 1991).

Esta bactéria possui mais de 450 hospedeiros distribuídos em cerca de 54 famílias botânicas (WICKER et al., 2007). Foi relatada pela primeira vez em 1896 por Erwin F. Smith, nos Estados Unidos da América, colonizando batata (*Solanum tuberosum* L.), tomate e berinjela (*Solanum melongena* L.) (HAYWARD, 1994). No Brasil, a bactéria foi relatada inicialmente em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e batata no ano de 1922, no estado do Rio Grande do Sul, por Von Parseval (TAKATSU; LOPES, 1997). Em Pernambuco, esta bacteriose foi relatada pela primeira vez em pimentão (*Capsicum annuum* L.), em 1987 por Mariano (MARIANO et al., 1989). Atualmente, está amplamente disseminada em áreas produtoras de tomate no país, nos estados da Amazônia, Bahia, Espírito Santo, Maranhão,



Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima e São Paulo. Nas regiões produtoras de Pernambuco, a murcha bacteriana é um fator limitante para o cultivo de solanáceas, inclusive restringindo o cultivo de tomate e pimentão na mesorregião da zona da Mata (MALAVOLTA JÚNIOR et al., 2008).

A bactéria *R. solanacearum* é um bastonete Gram-negativo, habitante do solo e aeróbico, com aproximadamente 0,5 x 1,5 µm, não formadora de esporos. Isolados virulentos são essencialmente não flagelados e não móveis, enquanto os isolados avirulentos têm alta motilidade sendo providos de 1 a 4 flagelos. Acumula poli-β-hidroxi-butirato como reserva de carbono. Embora, não produza pigmento fluorescente, produz pigmento marrom em meio de cultura sólido contendo tirosina. Frequentemente, pode reduzir nitrato a nitrito com produção de gás, mas, não hidrolisa o amido. É fraca degradadora de gelatina e não utiliza arginina ou betaina como fonte de carbono. É tolerante a sais e cresce em temperatura entre 25 a 35°C, variando de acordo com os isolados (MEHAN et al., 1994).

O gênero *Ralstonia* pertence ao domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe β-Proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae (EUZÉBY, 2009). A classificação dessa bactéria reflete seu alto grau de diversidade genética, adaptação a gama de hospedeiros e condições climáticas. Assim, *R. solanacearum* foi classificada inicialmente em cinco raças (1-5), definidas pela gama de hospedeiros (HE; SEQUEIRA; KELMAN, 1983) e seis biovars (1, 2A, 2T ou N2, 3, 4 e 5), com base em características bioquímicas (HAYWARD, 1994). Devido a simplicidade e praticidade, estas classificações foram largamente empregadas, mas por não refletirem toda a heterogeneidade dos isolados de *R. solanacearum* (PINHEIRO et al., 2011), foram substituídas pela classificação baseada em quatro níveis hierárquicos: espécie, filotipo (I a IV), sequevar (53) e linhagem clonal (PRIOR; FEGAN, 2005). Desta forma, o complexo de espécies de *R. solanacearum* divide-se em quatro filotipos determinados com base nas sequências dos espaçadores intergênicos (*ITS*) 16S-23S rRNA e dos genes *hrpB* (regulador de patogenicidade) e *egl* (endoglucanase), bem como em hibridização genômica comparativa (FEGAN; PRIOR, 2005; GUIDOT et al., 2007), sendo fortemente relacionados à região geográfica do patógeno. Assim, os filotipos I, II e III agrupam isolados oriundos da Ásia, América, África e ilhas vizinhas, respectivamente. Já o filotipo IV agrupa isolados mais heterogêneos, oriundos da Indonésia, Japão, Austrália e Filipinas (PRIOR; FEGAN, 2005; SAFNI et al., 2014), sendo o grupo com maior diversidade. Os isolados também foram agrupados em sequevares, com base nas sequências de nucleotídeos muito conservadas do gene *egl* sendo até o momento determinados 53 sequevares de *R. solanacearum* (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Recentemente, o complexo *R. solanacearum* foi reclassificado com base na análise filogenética das sequências parciais do gene *egl*, sequências da *ITS* do rRNA 16S-23S e hibridização DNA-DNA, demonstrando que este complexo compreende três espécies (SAFNI et al., 2014). Os isolados do filotipo II permaneceram como *R. solanacearum*, os isolados dos filotipos I e III foram reclassificados como *R. pseudosolanacearum* Safni et al. e os isolados do filotipo IV foram reclassificados como *R. syzygii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al. Esta última espécie contém três grupos: o que causa a doença de Sumatra do cravo da Índia na Indonésia, *R. syzygii* subsp. *syzygii* Safni et al., o que afeta diversos hospedeiros também na Indonésia, *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* Safni et al. e a “blood disease bacterium” (BDB), que causa a “banana blood disease”, *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* Safni et al. Essa reclassificação foi validada por Prior et al. (2016) ao concluírem que dados fenotípicos, genômicos e proteômicos convergem para o modelo de três subespécies no complexo *R. solanacearum*. As classificações atuais são consideradas pela comunidade científica mais representativas quanto a diversidade genética, gama de hospedeiros e origem geográfica.

### **Murcha bacteriana: Ciclo e manejo da doença**

No Brasil, a murcha bacteriana tem sido relatada em várias regiões do país e em diversas culturas economicamente importantes (GARCIA et al., 2013; MARIANO et al., 1989; TAKATSU; LOPES, 1997).

A principal via de penetração de *R. solanacearum* no hospedeiro é através de ferimentos nas raízes, seguindo-se a invasão da bactéria nos espaços intercelulares do córtex da raiz, em menos de quatro horas e a colonização generalizada desses espaços e de todo parênquima vascular após dois a três dias (SAILE et al., 1997). As células bacterianas produzem exopolissacarídeo (EPS) de alta viscosidade, que é considerado o principal fator de virulência deste patógeno, pois obstrui parcial ou totalmente o xilema, reduzindo o transporte de água para a parte aérea da planta. A infecção por esta bactéria envolve prejuízos fisiológicos irreversíveis às plantas hospedeiras, uma vez que sua patogenicidade está relacionada a um elaborado sistema de secreção (Secreção do Tipo III -SSTIII), com injeção de um complexo associado de proteínas efectoras que apresentam funções enzimáticas deletérias às células da planta (JACOBS et al., 2013).

O principal sintoma da doença em solanáceas é a murcha sem amarelecimento da parte aérea, cuja expressão varia de acordo com o hospedeiro, o isolado bacteriano e as condições ambientais (MOMOL; PRADHANANG; LOPES, 2008). Em plantas de tomateiro ocorre a murcha de folíolos e epinastia foliar. Com a evolução da doença, em condições favoráveis,

esse quadro de murcha afeta toda a planta tornando-se irreversível e causando a morte. Como a infecção é sistêmica, o corte do caule próximo ao solo mostra o sistema vascular escurecido e, sua compressão libera o pus bacteriano (MALAVOLTA JÚNIOR. et al., 2008).

A disseminação da *R. solanacearum* é feita possivelmente pela transmissão raiz-raiz, implementos agrícolas, ferimentos de raízes causados por nematoides e/ou desbastes de plantas, e principalmente pela água de irrigação. Isto porque a bactéria sobrevive em restos de cultura, no solo, na água, em hospedeiros alternativos e plantas invasoras (COUTINHO, 2005). Estudos de sobrevivência de *R. solanacearum* realizados em dez diferentes tipos de solos do estado de Pernambuco, bem como em caules e raízes de pimentão infectados, mostraram que a bactéria sobreviveu por um período de 42 a 77 dias nos solos, e por sete a 17 dias nos tecidos de caule e raiz (FÉLIX et al., 2012).

A murcha bacteriana é mais problemática no verão e em regiões de clima mais quente devido à predominância de temperaturas e umidades elevadas serem totalmente favoráveis ao seu desenvolvimento (COELHO NETO et al., 2004; TAKATSU; LOPES, 1997). Fatores abióticos como temperatura, pH, umidade e tipo de solo, em adição a fatores bióticos como presença e atividade de predadores, antagonistas e ou organismos competidores podem influenciar a sobrevivência da bactéria no solo (VAN VEEN; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 1997).

A dificuldade de manejo da doença está relacionada com a alta variabilidade genética do patógeno, rápida infecção, ampla capacidade de disseminação, sobrevivência e principalmente com a capacidade de infectar um grande número de plantas hospedeiras. A sobrevivência da bactéria no solo por longos períodos e em grandes profundidades torna o controle químico inviável e antieconômico. Assim, as principais medidas preconizadas para o manejo da murcha bacteriana são ações preventivas ou práticas culturais visando impedir ou retardar o aparecimento de *R. solanacearum* na cultura (SILVEIRA; MARIANO; MICHEREFF, 1996).

O uso de variedades resistentes no manejo da murcha bacteriana, assim como o controle químico, também apresenta limitações e pode não apresentar resultados efetivos. Isto porque a resistência do tomateiro a *R. solanacearum* é poligênica, ou seja, agrega um conjunto de genes que podem sofrer alterações fenotípicas aleatórias, em função da variabilidade e agressividade do isolado, da idade da planta, das temperaturas elevadas, alta umidade do solo e da infestação por nematoides, ocorrendo a quebra da resistência (WANG et al., 2000).

Assim sendo, as dificuldades de manejo da murcha bacteriana do tomateiro requerem pesquisas que subsidiem programas eficazes de prevenção e redução da doença e do inóculo,

utilizando métodos alternativos que viabilizem a produção economicamente e ambientalmente sustentável.

### **Óleos essenciais no controle da murcha bacteriana**

De acordo com a definição apresentada pela *European Pharmacopoeia* (7ª edição), os óleos essenciais (OE) são produtos aromáticos ou odorantes de composição complexa, obtidos de material botânico, que podem ser biossintetizados durante o metabolismo secundário, a partir de diferentes órgãos da planta: flores, folhas, sementes, rizomas e frutos (EL ASBAHANI et al., 2015). Os OE são biossintetizados, acumulados e armazenados em estruturas histológicas especializadas das glândulas secretoras das plantas (BOUWMEESTER et al., 1995). Existem dois tipos de glândulas secretoras, as localizadas na superfície das plantas, com secreção exógena e as localizadas em órgão internos, com secreção endógena. Todas elas estão localizadas no citoplasma das células secretoras de muitos órgãos da planta e distribuindo-se de diferentes formas (SVOBODA; GREENAWAY, 2003).

Os OE apresentam características físico-químicas de interesse em várias áreas de estudo devido as suas atividades adstringentes, antivirais, bactericidas, bacteriostáticas, estimulantes, fungicidas, fungistáticas, imunoestimulantes e inseticidas a numerosos agentes patogênicos (bactérias, vírus e fungos), como por exemplo, o efeito bactericida em bactérias multirresistentes na área médica (BURT, 2004; KNAAK; FIUZA, 2010).

Um dos enfoques da agricultura moderna é o controle de doenças de plantas pelo uso dos OE com atividade antimicrobiana. Estudos com o óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer apresentou ação sobre a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira Silva et al. (2014); o óleo de cravo a 0,5% apresentou ação bactericida às bactérias Gram-negativas (*Rhizobium rhizobacter* (Beijerinck and van Delden) Young et al. – sin. *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al. – sin. *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* (Jones) Dye e *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (Brown) Vauterin et al. – sin. *X. campestris* pv. *pelargonii* (Brown) Vauterin et al. e Gram-positivas (*Streptomyces* spp. e *Rhodococcus fascians* (Tilford) Goodfellow) em plantas de tomate e gerânio (HUANG; LAKSHMAN, 2010).

A biofumigação é uma técnica de desinfestação do solo através da adição de matéria orgânica ou OE que liberam substâncias tóxicas aos patógenos (BAPTISTA et al., 2006). A aplicação de OE no solo é considerada biofumigação, porque os óleos extraídos de várias plantas são constituídos de moléculas químicas altamente voláteis, com propriedades

antimicrobianas, capazes de penetrar na membrana celular e causar ruptura na célula bacteriana (PARET; SHARMA; ALVAREZ, 2012). O efeito biofumigante dos OE de palmarosa e capim limão foi verificado sobre isolados de *R. solanacearum* em tomateiro e pimentão, respectivamente, tanto em casa de vegetação como em condições de campo (ALVES et al., 2014; PARET et al., 2010). Da mesma forma, o óleo de cravo a 0,5%, reduziu a população de *R. solanacearum* em tomateiro e gerânio cultivados em solo infestado, atenuando a incidência da murcha bacteriana e apresentando um controle da doença de até 100% (HUANG; LAKHSMAN, 2010). Em tomateiro foi avaliado o uso de óleos essenciais de cravo, tomilho, alecrim e seus componentes majoritários, aplicados no solo em torno das raízes, no controle da murcha de Fusarium. Todos os produtos testados foram capazes de reduzir a doença, sendo os melhores resultados obtidos com o óleo de cravo, no entanto óleo de alecrim também foi eficaz no controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (LA TORRE et al., 2016).

Desta forma, o uso de óleos essenciais no manejo de doenças causadas por patógenos residentes no solo apresenta-se como uma alternativa potencial e sustentável, com efeitos biológicos e econômicos menos impactantes ao ambiente.

### **Silício no controle de doenças de plantas**

Recentemente, pesquisas com estudos bioquímicos e moleculares, apontam o silício (Si) como um importante ativador da expressão e estabilidade de genes de resistência a diversos patógenos em plantas de tomateiro, sobretudo em patossistemas envolvendo *R. solanacearum* (ANDRADE et al., 2013; GHAREEB et al., 2011). Diversos estudos têm demonstrado que o incremento de Si no solo ou substrato, pode potencializar a resistência genética, mesmo em plantas não acumuladoras desse elemento, como o tomateiro (DANNON; WYDRA, 2004; DIOGO; WYDRA, 2007).

O Si é um elemento multifuncional que apresenta resultados significativos no incremento da tolerância de plantas a metais pesados, estresse hídrico, salino e ataque de patógenos (LIANG et al., 2005). O aumento dos níveis de tolerância nas plantas promovidos pelo Si envolve mecanismos bioquímicos e moleculares mediados pelos polímeros de óxido de silício (SiO<sub>2</sub>) que se acumulam na parede celular e atuam nas rotas metabólicas específicas na ativação de sinais moleculares para atividade de enzimas antioxidantes (SAHEBI et al., 2015).

Estudos realizados com o Si evidenciaram a sua importância na ativação de genes que promovem a produção de enzimas relacionadas com os mecanismos de defesa da planta.

Além disso, vários trabalhos demonstram incrementos significativos da taxa fotossintética, melhoria da arquitetura foliar e de outros processos no metabolismo vegetal, tendo como resultado final um aumento e maior qualidade na produção (LIMA FILHO et al., 1999; FERREIRA et al., 2015; MENDONÇA et al., 2013). Os mecanismos envolvidos na proteção de plantas pelo Si envolvem a polimerização desse elemento na superfície inferior da folha, processo denominado silicificação e a formação de barreiras físicas pelo acúmulo e deposição nas células da camada epidérmica, constituindo-se em uma barreira mecânica efetiva na penetração do patógeno (POZZA et al., 2004).

A aplicação de Si reduziu significativamente a incidência da murcha bacteriana em genótipos; suscetível (L390) e moderadamente resistente (King Kong 2) de tomateiro. Os resultados sugeriram o Si como indutor de resistência, uma vez que houve correlações negativas entre o conteúdo de Si na raiz e o número de bactérias na parte mediana do caule (DANNON; WYDRA, 2004). Nos genótipos King Kong 2 e Hawaii 7998 (moderadamente resistente), a aplicação do Si reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em 33,8% e 81,2%, respectivamente (AYANA et al., 2011). Estes trabalhos e outras inúmeras pesquisas que vêm sendo desenvolvidas, comprovam o efeito da suplementação do Si na proteção de plantas através da ativação de genes de resistência e na modulação e expressão de proteínas, atuando como *priming* da expressão de proteínas relacionadas ao sistema de defesa do tomateiro (CHEN et al., 2014; GAREEB et al., 2011).

O Si desempenha um papel essencial, quando incorporado à parede celular, visto que é análogo ao da lignina, componente estrutural resistente a compressão. A incorporação do Si tem pelo menos dois efeitos positivos do ponto de vista energético: o seu custo é 3,7% daquele relativo à incorporação da lignina e melhora a interceptação da luz solar, portanto, da fotossíntese, devido à melhor arquitetura das plantas supridas com grande quantidade deste elemento (EPSTEIN, 1999; MA et al., 2001; MA; YAMAJI, 2006; RAVEN, 1983).

Trabalhos realizados com incremento de Si na produção de tomateiro envolvendo a resistência à murcha bacteriana demonstraram através de técnicas bioquímicas e moleculares, a efetividade do silício na transcrição de sinais para regulação e expressão de genes que ativam proteínas de resistência (PR-proteínas), tais como  $\beta$ -1,3 glucanases, peroxidases e fenilalanina amônia-liases. Estas PR-proteínas são compostos metabólicos secundários produzidos pela planta com ação antimicrobiana, capazes de inibir ou retardar o ataque dos patógenos (ANDRADE et al., 2013; BORGES et al., 2013; GHAREEB et al., 2011).

No metabolismo da planta, a via dos fenilpropanóides é uma das mais importantes porque produz uma variedade de compostos fenólicos relacionados à defesa, sendo

fenilalanina amônia-liase (FAL) a enzima chave desse processo. A FAL catalisa a formação do ácido trans-cinâmico, precursor de vários compostos de defesa das plantas (WEN et al., 2005). As peroxidases (POX) estão presentes em todos os compartimentos celulares e catalisam a transferência de elétrons de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando diferentes substratos reduzidos como doadores. A atividade de POX em plantas é aumentada em resposta a diferentes estresses biótico e abiótico, por participarem nos processos de reforço da parede celular de plantas hospedeiras como a oxidação de fenóis, suberização e lignificação durante as reações de defesa contra patógenos (SYROS et al., 2004). Em plantas de tomateiro, a POX está envolvida na última etapa de lignificação da parede celular (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

A  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) possui atividade hidrolítica, exercendo o controle de doenças mediante a quebra de polímeros estruturais ( $\beta$ -1,3-glucanos e quitina) presentes nas paredes dos patógenos e liberando oligossacarídeos biologicamente ativos (elicitors e supressores) capazes de regular o estado de imunização da planta (CAVALCANTI et al., 2007). Alguns trabalhos correlacionaram a redução de doenças causadas por *R. solanacearum* a expressão destas enzimas como mecanismo de defesa vegetal. Aumentos da atividade da POX em plantas tratadas com Si foram observados na murcha bacteriana em pimentão (ALVES, 2012). Em tomateiro, análises imuno-histoquímicas sugeriram uma indução de resistência basal em nível de parede celular após tratamento com silício envolvendo mudanças na estrutura de polissacarídeos pécticos (DIOGO; WYDRA, 2007). Enzimas relacionadas a defesa da planta (POX e GLU) tiveram suas atividades aumentadas em plantas de bananeira tratadas com Si e inoculadas com a bactéria, especialmente naqueles com silicato de cálcio, indicando uma possível participação na redução da severidade do Moko da bananeira (ROLLEMBERG, 2013). Neste contexto, a suplementação de substratos ou solos com Si na produção de mudas de tomateiro pode representar uma estratégia no controle da murcha bacteriana através da ativação de respostas de defesa contra *R. solanacearum*.

Considerando a importância da murcha bacteriana para o cultivo do tomateiro e o difícil manejo desta doença, os objetivos deste estudo foram avaliar a eficiência da biofumigação do solo com óleos essenciais e a produção de mudas de tomateiro em substrato tratado com silício, no controle da murcha bacteriana, visando a inserção destas medidas no manejo da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, G. M. R.; SANTOS, L. A.; FÉLIX, K. C. S.; ROLLEMBERG, C. L.; SILVA, A. M. F.; SOUZA, E. B.; CELLIER, G.; PRIOR, P.; MARIANO, R. L. R. Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 11, p. 1175-1182, 2014.

ALVES, A. O. **Controle alternativo da murcha bacteriana do pimentão utilizando óleos essenciais vegetais e silicato de cálcio**. 2012, 93 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ALVES, A. O.; SANTOS, M. M. B.; SANTOS, T. C. G.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Biofumigation with essential oils for managing bacterial wilt of sweet peppers. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 96, n. 2, p. 363-367, 2014.

ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; FERRAZ, H. G. M.; MOREIRA, W. R.; OLIVIERA, J. R.; MARIANO, R. L. R. Silicon reduces bacterial speck development on tomato leaves. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 436-442, 2013.

AYANA, G.; FININSA, C.; AHMED, S.; WYDRA, K. Effect of soil amendment on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and tomato yields in Ethiopia. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 51, n. 1, p. 72-76, 2011.

BAPTISTA, M.; SOUZA, R. B.; PEREIRA, W.; LOPES, C. A.; CARRIJO, O. A. Efeito da solarização e biofumigação na incidência da murcha bacteriana em tomateiro no campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 161-165, 2006.

BORGES, I.V.; PEIXOTO, A. R.; CAVALCANTI, L. S.; LIMA, M. A. G.; SILVA, M. S. Extrato de jurema preta no controle de mancha-de-alternaria em melancia. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 3, p. 36-45, 2013.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 233-253, 2004.

BOUWMEESTER, H. J.; DAVIS, J. A. R.; TAXOPEUS, H. Enantiomeric composition of carvone, limonene, and carveols in seed of dill and biennial caraway varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 43, n. 1, 357-364, 1995.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. A. G.; Oliveira, J. T. A. An aqueous suspension of *Crinipellis perniciosa* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 5, p. 729-738, 2007.

CHEN, Y.; LIU, M.; WANG, L.; LIN, W.; FAN, X.; CAI, K. Proteomic characterization of silicon-mediated resistance against *Ralstonia solanacearum* tomato. **Plant and Soil**, Plague, v.1, n.387, p. 387-425, 2014.



COELHO NETTO, R. A.; PEREIRA, B. G.; NODA, H.; BOHER, B. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 21-27, 2004.

COUTINHO, T. A. Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum*. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. Saint Paul: APS Press, 2005. p. 29-38.

DANNON, E.; WYDRA, K. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, n. 5, p. 233-243, 2004.

DIOGO, R.V.C.; WYDRA K. Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polisaccharide structure. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 70, n. 4-6, p. 120-129, 2007.

EL ASBAHANIA, A.; MILADIC, K.; BADRIC, W.; SALAC, M.; AÏT ADDIB, E. H.; CASABIANCAD, H.; EL MOUSADIKE, A.; HARTMANNA, D.; JILALEE, A.; RENAUDA, F. N. R.; ELAISSARIC, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 483, n 1-2, p. 220-243, 2015.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, 1999.

EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. France, 2009. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>>. Acesso em: 01 Fev. 2016.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Croops and crops processed - tomato**. FAOSTAT. 2015. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 07 Fev. 2016.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: ALLEN C.; PRIOR P.; HAYWARD A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. Saint Paul: APS Press, 2005. p. 449-461.

FÉLIX, K. C.; SOUZA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Survival of *Ralstonia solanacearum* in infected tissues of *Capsicum annuum* and in soils of the state of Pernambuco, Brazil. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 40, n. 1, p. 53-62, 2012.

FERREIRA, H. A.; NASCIMENTO, C. W. A.; DATNOFF, L. E.; NUNES, G. H. S.; PRESTON, W.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Effects of silicon on resistance to bacterial fruit blotch and growth of melon. **Crop Protection**, Guildford, v. 78, p. 277-283, 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 402p.

GARCIA, A. L.; SOUZA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt in bell pepper in the state of Pernambuco, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 95, p. 237-245, 2013.

GHAREEB, H.; BOZSÓ, Z.; OTT, P. G.; REPENNING, C.; STAHL, F.; WYDRA, K. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 75, n. 3, p. 83-89, 2011.

GROVER, A.; AZMI, W.; GADEWAR, A. V.; PATTANAYAK, D.; NAIK, P. S.; SHEKHAWAT, G. S.; CHAKRABARTI, S. K. Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 4, p. 798-806, 2006.

GUIDOT, A.; PRIOR, P.; SCHOENFELD, J.; CARRE`RE, S.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 2, p. 377-387, 2007.

HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 65-87, 1991.

HAYWARD, A. C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* an related bacteria. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. **Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 123-135.

HE, L. Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 12, p. 1357-1361, 1983.

HUANG, Q.; LAKSHMAN, D. K. Effect of clove oil on plant pathogenic bacteria and bacterial wilt of tomato and geranium. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 92, p. 701-707, 2010.

IBGE. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. **Estatística da Produção Agrícola 2015**. Disponível em: <[www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_2015](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_2015)>. Acesso em: 07 Fev. 2016.

JACOBS, J. M.; MILLING, A.; MITRA, R. M.; HOGAN, C. S.; AILLOUD, F.; PRIOR, P.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* requires PopS, an ancient AvrE-family effector, for virulence and to overcome salicylic acid-mediated defenses during tomato pathogenesis. **MBio (ASM)**, Ann Arbor, v. 4, n. 6, p. e00875-13, 2013.

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

LA TORRE, A.; CARADONIA, F.; MATERE, A.; BATTAGLIA, V. Using plant essential oils to control Fusarium wilt in tomato plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 144, n. 3, p. 487-496, 2016.

LIANG, Y. C.; SUN, W. C.; SI, J.; ROMHELD, V. Effects of foliar and root applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 54, n. 5, p. 678-685, 2005.

LIMA FILHO, O. F.; LIMA, M. T. G.; TSAI, S. U. Supressão de patógenos em solos supressão de patógenos em solos Induzida por agentes abióticos: induzida por agentes abióticos: induzida por agentes abióticos: O caso do silício. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v.1, n. 87, p. 8-12, 1999.

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa-CNPq, 1994. 61p.

MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. (Eds.). **Silicon in agriculture**. Netherlands: Elsevier Science, 2001, v. 8, cap. 2, p. 17-39.

MA, J. F.; YAMAJI, N. Silicon up take and accumulation in higher plants. **Plant Science**, Oxford, v. 11, n. 8, p. 392-397, 2006.

MACIEL, G. M.; FERNANDES, M. A. R.; MELO, O. D.; OLIVEIRA, C. S. Potencial Agrônômico de Híbridos de minitomates com hábitos de crescimento determinado e indeterminado. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 144-148, 2016.

MALAVOLTA JÚNIOR., V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 34, n. 1, p. 1-88, 2008.

MARIANO, R. L. R.; MELO, R. A. G.; HOLANDA, V. T.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. Levantamento das fitobacterioses do Estado de Pernambuco no biênio 1987-1988. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 158, 1989.

MEHAN, V. K.; LIAW, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D.; HAYWOD, A. C. **Bacterial wilt of groundnut**. Patancheru: Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1994. 28p. (Information Bulletin, 35).

MELO, N. C.; SOUZA, L. C.; SILVA, V. F. A.; GOMES, R. F. OLIVEIRA NETO, C. F.; PIRES, COSTA, D. L. P. Cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) hidropônico sob diferentes níveis de fósforo e potássio em solução nutritiva. **Revista Agroecossistemas**, Pará, v. 6, n. 1, p. 10-16, 2014.

MENDONÇA, A. O.; TAVARES, L. C.; BRUNES, A. P.; MONZÓN, D. L. R.; VILLELA, F. A. Acúmulo de silício e compostos fenólicos na parte aérea de plantas de trigo após a adubação silicatada. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1154-1162, 2013.

MOMOL, T.; PRADHANANG, P.; LOPES, C. A. **Bacterial wilt of pepper**. EDIS: University of Florida IFAS Extension, 2008. 189p.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, 1992.

PARET, M. L.; KRATKY B. A.; ALVAREZ A. M. Effect of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* race 4 and bacterial wilt of edible ginger. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 5, p. 521-527, 2010.

PARET, M. L.; SHARMA, S. K.; ALVAREZ, A. M. Characterization of biofumigated *Ralstonia solanacearum* cells using micro-Raman spectroscopy and electron microscopy. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 1, p. 105-113, 2012.

PEIXOTO, A. R. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. *fluorescentes*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 153-160, 1997.

PINHEIRO, C. R.; AMORIM, J. A. E.; DINIZ, L. E. C.; SILVA, A. M. F.; TALAMINI, V.; SOUZA JÚNIOR, M. T. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto à filotipos e sequevares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 593-602, 2011.

POZZA, A. A. A.; ALVES, E.; POZZA, E. A.; CARVALHO, J. G.; MONTANARI, M.; GUIMARÃES, P. T. G.; SANTOS, D. M. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, 2004.

PRIOR, P.; AILLOUD, F.; DALRING, B. L.; REMENANT, B.; SANCHEZ, B.; ALLEN, C. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics**, London, v. 17, n. 90, 2016. DOI: 10.1186/s12864-016-2413-z.

PRIOR, P.; FEGAN, M. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 695, n. 1, p. 127-136, 2005.

RAVEN, J. A. The transport and function of silicon in plants. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 58, n. 1, p. 179-207, 1983.

ROLLEMBERG, C. S. **Uso do silício na micropropagação visando o manejo da murcha-de fusário e do Moko da bananeira**. 2013, 104 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L.; KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: Proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, n. 9, p. 3087-3103, 2014.

SAHEBI, M.; HANAFI, M. M.; AKMAR, A. S. N.; RAFII, M. Y.; AZIZI, P.; TENGOUA, F. F.; AZWA, J. N. M.; SHABANIMOFRAD, M. Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. **BioMed Research International**, London, v. 2015, ID 396010, p. 1-16, 2015. DOI:10.1155/2015/396010

SAILE, E.; MCGARVEY, J. A.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 12, p. 1264-1271, 1997.

SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. S.; NEPA, H. B. S.; PAZ, C. D.; SOUZA, A. V. V. Estudos dos constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de

*Lippia gracilis* a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* "in vitro". **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna v. 40, n. 3, p. 277-280, 2014.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVEIRA, N. S. S.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 22, n. 2, p. 97-111, 1996.

SVOBODA, K.; GREENAWAY, R. I. Lemon scented plants. **International Journal of Aromatherapy**, Boulder, v. 13, n. 1, p. 23-32, 2003.

SYROS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, H.; ECONOMOU, A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 1, p. 69-77, 2004.

TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 170-177, 1997.

VAN VEEN, J. A.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 61, p. 121-135, 1997.

WANG, J. F.; OLIVIER, J.; THOQUET, P.; MANGIN, B.; SAUVIAC, L.; GRIMSLEY, N. H. Resistance of tomato line hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 13, n. 1, p. 6-13, 2000.

WEN, P. F.; CHEN, J. Y.; KONG, W. F.; PAN, Q. H.; WAN, S. B.; HUANG, W. D. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. **Plant Science**, Limerick, v. 169, n. 5, p. 928-934, 2005.

WICKER, E.; GRASSRT, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M.; PRIOR, P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 21, p. 6790-6801, 2007.

**CAPÍTULO II**

---

**Óleos essenciais no controle da murcha bacteriana do tomateiro**

# Óleos Essenciais no Controle da Murcha Bacteriana do Tomateiro

Meridiana A. G. Lima<sup>1</sup> · Ana Rosa Peixoto<sup>2</sup> · Leonardo S. Cavalcanti<sup>3</sup> Angélica

Lucchese<sup>3</sup>. Elineide B. Souza<sup>1</sup> · Rosa L. R. Mariano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, 48900-000, Juazeiro, BA, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal do Vale do São Francisco

<sup>4</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil

**Autor para correspondência: Rosa L. R. Mariano, e-mail: rrmbac@gmail.com**

## Resumo

Foram testados os óleos essenciais de gengibre e melaleuca a 1 %, alecrim a 0,50 % e bergamota, capim limão, cravo, citronela, eucalipto, laranja doce, palmarosa e sálvia a 0,14 % (v/v). Os óleos foram emulsionados em Tween 20 na proporção de 1:1, antes de serem adicionados ao meio de cultura para o teste *in vitro* e ao solo infestado com *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) para o ensaio da biofumigação. Foram avaliadas: a população de *Rs* no solo antes e sete dias depois da biofumigação; os componentes de resistência à doença e o crescimento das plantas em tomateiros da cv. TY 2006, aos 15 dias após o transplante. No ensaio *in vitro*, os óleos de alecrim, capim limão, citronela, cravo, eucalipto e palmarosa inibiram completamente o crescimento de *Rs*. A população de *Rs* no solo foi reduzida pelos óleos de alecrim, cravo, capim limão, gengibre, melaleuca e palmarosa, destacando-se o cravo

26 com redução de 42,3 %. A biofumigação com o óleo de cravo reduziu a incidência, o índice  
27 de murcha bacteriana e a área abaixo da curva de progresso da doença em 90,2; 97 e 98,8 %,   
28 respectivamente e elevou o período de latência em 10 dias. Este óleo apresentou o eugenol  
29 como constituinte majoritário (87 %), com os mesmos efeitos na redução dos componentes de  
30 resistência da doença. O óleo de cravo e o acetato de eugenol não reduziram a altura,  
31 biomassa fresca e seca das plantas. Assim sendo, recomenda-se a biofumigação do solo com o  
32 óleo de cravo a 0,14 % como um componente no manejo da murcha bacteriana do tomateiro.

33

34 **Palavras-chave** *Caryophyllus aromaticus* • *Ralstonia solanacearum* • *Solanum lycopersicum* •  
35 controle • óleo de cravo

36

37

## 38 **Introdução**

39

40 A murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.  
41 (*Rs*) é atualmente considerada um dos principais problemas que afetam a produção do  
42 tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em todo mundo (Ghareeb et al. 2011). Esta bactéria  
43 apresenta-se como um complexo de espécies com aspectos bioquímicos e moleculares que  
44 conferem resistência, adaptação a diferentes condições ambientais e ampla gama de  
45 hospedeiros (Fegan e Prior 2005).

46 No Brasil, a murcha bacteriana tem sido relatada em várias regiões do país e em diversas  
47 culturas economicamente importantes tais como: bananeira (*Musa* spp. L.), batata (*Solanum*  
48 *tuberosum* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) e tomateiro  
49 (Takatsu e Lopes 1997; Garcia et al. 2013). A bactéria encontra-se amplamente disseminada  
50 nas principais áreas produtoras de tomate no Brasil, nos estados da Amazônia, Bahia, Espírito  
51 Santo, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima e São Paulo,



52 ocasionando perdas na produção que podem atingir até 100 % do volume plantado (Malavolta  
53 Júnior et al. 2008)

54 Segundo Rocha e Moura et al. (2013), o manejo da murcha bacteriana está restrito às medidas  
55 de exclusão que visam impedir a entrada da bactéria em áreas onde *Rs* ainda não é residente  
56 no solo, bem como o uso de variedades tolerantes. No entanto, devido às dificuldades em se  
57 achar boas fontes de resistência aos diferentes filotipos e sequevares de *Rs*, e ao fato de que, a  
58 resistência do tomateiro à murcha bacteriana é do tipo poligênica e pode sofrer interferência  
59 do ambiente ou traz consigo características agrônômicas indesejáveis, a efetividade do  
60 controle com uso de variedades tolerantes é limitada (Lopes e Ávila 2005). O controle de *Rs*  
61 no solo é considerado difícil, sobretudo pela ausência de tratamentos curativos, uma vez que  
62 não há antibióticos registrados para uso contra esta fitobacteriose no Brasil (Roskopf et al.  
63 2005; Alves et al. 2014). Resultados positivos com o uso de óleos essenciais para redução da  
64 murcha bacteriana foram relatados em casa de vegetação e campo para bananeira (Amorim et  
65 al. 2011), gengibre (Paret et al. 2010, 2012), pimentão (Alves et al. 2014), tomate e gerânio  
66 (Huang e Lakhsman 2010) e tomate (Abo-Elyousr et al. 2014).

67 Na biofumigação do solo com óleos essenciais, as moléculas químicas altamente voláteis,  
68 com propriedades antimicrobianas, são capazes de penetrar na membrana plasmática e causar  
69 ruptura na célula bacteriana (Paret et al. 2010). No entanto, poucos estudos têm se  
70 aprofundado quanto à caracterização química e atuação das moléculas majoritárias na redução  
71 das doenças e efeitos sobre o patógeno.

72 Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito de óleos essenciais na inibição de *Rs*  
73 *in vitro*, na biofumigação do solo infestado sobre a população de *Rs*, nos componentes de  
74 resistência à murcha bacteriana e crescimento de plantas de tomateiro híbrido ‘TY 2006’;  
75 caracterizar o óleo essencial mais eficiente quanto à composição química e comparar a  
76 eficiência do óleo puro com a do seu componente bioativo.

78

## 79 **Materiais e Métodos**

80

### 81 **Obtenção, cultivo e identificação do isolado bacteriano**

82

83 Utilizou-se o isolado UNEB01, obtido de tomateiro com sintomas severos da murcha  
84 bacteriana, proveniente de uma área produtora no município de Petrolina-PE (S 09° 03' 312"  
85 W 040° 22' 38,7"). A patogenicidade do isolado foi testada, completando-se os postulados de  
86 Koch em plantas de tomateiro cv. Santa Clara, padrão de suscetibilidade à murcha bacteriana  
87 (Cardoso et al. 2012). O isolado foi identificado como *Ralstonia solanacearum* filotipo IIA-  
88 38, utilizando para determinação da espécie e filotipo a técnica de PCR multiplex (Pmx-PCR)  
89 com os primers (Nmult:21:1F, Nmult:21:2F, Nmult:23:AF, Nmult:22:InF, Nmult:22:RR, 759  
90 e 760) (Fegan e Prior 2005; Opina et al. 1997; Safni et al. 2014).

91 A suspensão bacteriana utilizada nos experimentos foi preparada a partir do cultivo em meio  
92 tetracloreto de trifetil tetrazólio (TZC) (Kelman 1954) por 48 h a 28 °C. Colônias com  
93 características típicas: mucoides, irregulares e de coloração branca, foram transferidas para  
94 água destilada esterilizada (ADE). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em  
95 espectrofotômetro (Analyzer 500, Analyzer) para  $5 \times 10^8$  UFC/mL.

96

### 97 **Óleos essenciais**

98

99 Foram utilizados óleos vegetais 100 % puros de: alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.),  
100 bergamota (*Citrus aurantium* var. *bergamia* L.), capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapf.),  
101 citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), cravo (*Caryophyllus aromaticus* L.), eucalipto  
102 (*Eucalyptus citriodora* Hook), gengibre (*Zingiber officinalis* (Willd.) Roscoe), laranja doce  
103 (*Citrus sinensis* L.), melaleuca (*Melaleuca alternifolia* (Maiden e Betche.) Cheel), palmarosa

104 (*Cymbopogon martini* (Roxb.) J.F. Watson) e sálvia (*Salvia sclarea* L.), produzidos pela  
105 Bioessência (Florananda Indústria e Comércio de Cosméticos e Produtos Naturais Ltda.). Em  
106 todos os experimentos, foram usadas as concentrações de: 1,0 %, para gengibre e melaleuca,  
107 0,5 % para alecrim e citronela e 0,14 % para os demais óleos (v/v). As concentrações testadas  
108 foram baseadas em resultados de ensaios preliminares com doses mínimas de inibição do  
109 crescimento *in vitro* de *Rs*. Para aumentar a solubilidade, os óleos testados foram  
110 emulsionados em tween 20 na proporção de 1:1 (v/v) em todos os experimentos.

111

### 112 **Sensibilidade *in vitro* de *R. solanacearum* aos óleos essenciais**

113

114 O volume de 250 mL de meio NYDA (10 g dextrose, 3 g extrato de carne, 5 g extrato de  
115 levedura, 3 g peptona e 18 g de ágar/L) foi utilizado para cada tratamento. Foram misturados  
116 ao meio 350 µL, 1,25 mL e 2,5 mL dos óleos para atingir as concentrações finais de 0,14, 0,5  
117 e 1 % (v/v), respectivamente. O meio misturado a cada óleo em suas respectivas  
118 concentrações foi adicionado em placas de Petri e resfriado em câmara de fluxo laminar por  
119 20 min. Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana de *Rs*, diluída até  $10^{-6}$  foi espalhada  
120 sobre o meio, com incubação a 28 °C durante 72 h, quando foi realizada a contagem do  
121 número de colônias por placa e calculado o número de unidades formadoras de colônias  
122 (UFC)/mL. O meio com adição de 2,5 mL de tween 20 representou a testemunha. O  
123 experimento teve delineamento inteiramente casualizado e foi constituído por 12 tratamentos  
124 (11 óleos essenciais ± testemunha) com quatro repetições, cada uma com cinco placas.

125

### 126 **Biofumigação do solo com óleos essenciais**

127

128 O solo coletado no campus da Universidade Estadual da Bahia, Departamento de Tecnologia  
129 e Ciências Sociais (DTCS), no município de Juazeiro-BA, foi analisado e misturado com areia

130 na proporção de 2:1 (v/v). O solo foi autoclavado por 2 h sucessivamente em intervalos de 24  
131 h e após sete dias, adicionou-se 10 mL da suspensão do isolado de *Rs* a cada 250 g de solo,  
132 misturando-se uniformemente e incubando-se por 72 h.

133 Alíquotas de 350 µL de óleo de bergamota, capim limão, cravo, citronela, eucalipto, laranja  
134 doce, palmarosa e sálvia foram emulsionados separadamente em tween 20 (1:1) (v/v),  
135 misturados com 10 mL de água destilada esterilizada e distribuídos em 250 g de solo  
136 infestado dentro de sacos plásticos, obtendo-se uma concentração final de 0,14 % (v/v). Da  
137 mesma forma foram adicionados 1,3 mL de óleo de alecrim e citronela para obter  
138 concentração final de 0,5 % (v/v) e 2,5 mL do óleo de gengibre e melaleuca que compuseram  
139 a concentração final de 1 % (v/v), respectivamente. Os solos tratados com os óleos foram  
140 deixados em sacos plásticos para biofumigação sobre bancada em casa de vegetação ( $28 \pm 2$   
141 °C) por quatro dias. Após a abertura dos sacos, esperou-se três dias para o enchimento dos  
142 vasos e transplântio dos tomateiros. O experimento teve delineamento inteiramente  
143 casualizado com 14 tratamentos, sendo 11 óleos e três testemunhas: tween - solo infestado  
144 com *Rs* e tratado com 2,5 mL de tween 20/250 g de solo), para avaliar o efeito do tween 20  
145 sobre *Rs*; testemunha relativa: solo infestado com *Rs* e tratado com 40 mL de ADE; e  
146 testemunha absoluta: solo não infestado, sem tratamento com tween 20, nem óleos essenciais.  
147 Cada tratamento teve cinco repetições, cada uma com quatro plantas.

148

#### 149 **População de *R. solanacearum* em solos biofumigados com óleos essenciais**

150

151 Amostras com 1 g de solo infestado com *Rs* e tratado com os óleos foram misturadas a 10 mL  
152 de ADE, e 1 mL do sobrenadante foi retirado para iniciar uma diluição em série até  $10^{-7}$ .  
153 Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram plaqueadas em meio SMSA modificado  
154 (Engelbrecht 1994; Elphinstone et al. 1996) e as placas foram incubadas a 28 °C durante 72 h  
155 até a contagem das colônias e cálculo de UFC/g de solo. A população de *Rs* foi avaliada antes

156 da aplicação dos tratamentos (72 h após a infestação do solo) e sete dias após a aplicação dos  
157 tratamentos.

158

### 159 **Características químicas do solo biofumigado com óleos essenciais**

160

161 O solo utilizado em todos os ensaios foi submetido à análise química (Embrapa, 1999),  
162 determinando-se: P (disponível em  $\text{mg}/\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  trocáveis e acidez  
163 potencial ( $\text{H}+\text{Al}$ ), em  $\text{cmol}/\text{dm}^3$ , antes da biofumigação e aos quatro e sete dias após  
164 biofumigação. Para determinação do pH em água, amostras com 10 g de solo foram  
165 adicionadas a 25 mL de água destilada e misturadas manualmente a intervalos de 30 min,  
166 durante três horas. O pH foi determinado em pHmetro PHtek PHS-3B (pHtek Ltda.).

167

### 168 **Componentes de resistência à murcha bacteriana em plantas de tomateiro cultivadas em** 169 **solo biofumigado com óleos essenciais**

170

171 Sementes de tomateiro híbrido 'TY 2006' (Seminis Ltda.) foram semeadas em bandejas de  
172 poliestireno contendo substrato comercial e cultivadas em casa de vegetação por 30 dias,  
173 quando foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 250 mL contendo os  
174 solos infestados com *Rs* e biofumigados com os diferentes óleos essenciais.

175 Diariamente, durante 15 dias, as plantas foram avaliadas quanto à presença de sintomas,  
176 sendo determinados os seguintes componentes de resistência da doença: a) incidência (INC)  
177 da murcha bacteriana, calculada pela porcentagem de plantas infectadas em relação ao total de  
178 plantas inoculadas; b) período de latência ( $\text{PL}_{50}$ ), número de dias requeridos para o  
179 aparecimento de murcha em 50 % das plantas inoculadas (Silveira et al. 1999); e c)  
180 severidade da doença (SEV), com auxílio da escala de notas descritiva de 0 a 4 (Nielsen e  
181 Haynes 1960), onde 0 = ausência de sintomas, 1 = planta com 1/3 das folhas murchas, 2 =

182 planta com 2/3 das folhas murchas, 3 = planta totalmente murcha e 4 = planta morta. Com os  
183 dados médios de SEV foram determinados: a) índice de murcha bacteriana (IMB) aos 15 dias,  
184 calculado conforme McKinney (1923); e b) área abaixo da curva de progresso da doença  
185 (AACPD), conforme Shaner e Finney (1977). Conforme já mencionado, o experimento teve  
186 delineamento inteiramente casualizado e foi constituído por 14 tratamentos, com cinco  
187 repetições, cada uma com quatro plantas.

188

### 189 **Crescimento das plantas de tomateiro cultivadas em solo biofumigado com óleos** 190 **essenciais**

191

192 Ao final das avaliações quanto aos componentes de resistência da murcha bacteriana, as  
193 plantas foram avaliadas quanto a altura e biomassa fresca. Em seguida foram lavadas em água  
194 corrente, colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa a 60 °C por 72 h, avaliando-se a  
195 biomassa seca. Foi atribuído o valor nulo (0,00) para essas variáveis às plantas que morreram  
196 em consequência da murcha bacteriana.

197

### 198 **Composição química do óleo essencial de cravo**

199

200 Para a análise da composição química, 25 mg do óleo essencial de cravo foram previamente  
201 diluídas em 10 mL do solvente diclorometano. A quantificação foi realizada por  
202 cromatografia de fase gasosa acoplada a um detector de ionização em chama (CG/DIC)  
203 utilizando um cromatógrafo Varian® CP-3380 (Varian Printed USA), equipado com DIC e  
204 coluna capilar Chrompack CP-SIL 5 (30 m x 0,5 mm) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), espessura  
205 do filme 0,25 µm, temperatura do injetor 220 °C e do detector 240 °C, hélio como gás de  
206 arraste (1 mL/min), com programa de temperatura do forno de: 60 a 240 °C (3 °C/min), e  
207 isoterma de 240 °C por 20 min. A quantificação do percentual relativo dos constituintes

208 identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes, pelo  
209 método da normalização.

210 Para a identificação dos constituintes foi utilizada a cromatografia de fase gasosa acoplada à  
211 espectrometria de massa (CG/EM), utilizando um cromatógrafo Shimadzu® CG-2010  
212 (Shimadzu® Japan) acoplado a espectrômetro de massa CG/MS-QP 2010, coluna capilar DB-  
213 5ms (30 m x 0,25 mm) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), espessura do filme 0,25 µm, temperatura  
214 do injetor 220 °C, gás de arraste hélio (1 mL/min), temperatura da interface e da fonte de  
215 ionização 240 °C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização 0,7 kV e programa de  
216 temperatura semelhante ao descrito acima para cromatografia de fase gasosa. A identificação  
217 dos constituintes foi realizada através do cálculo dos índices de Kovats, obtidos pela  
218 coinjeção da amostra com uma série homóloga de n-alcenos (C<sub>8</sub> a C<sub>24</sub>) e da comparação dos  
219 espectros de massas com a biblioteca do equipamento.

220

221 **Atividade bactericida e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do óleo**  
222 **essencial de cravo e seu componente bioativo (acetato de eugenol) sobre *R. solanacearum***

223

224 Em uma placa de microtitulação, a cada poço foram adicionados 60 µL de meio líquido NYD  
225 (NYDA sem adição de ágar), 40 µL da suspensão bacteriana, com concentração ajustada para  
226  $5 \times 10^8$  UFC/mL, incubando-se a 29 °C por 24 h. Após formação e sedimentação das colônias  
227 nos fundos dos poços das placas, foram adicionadas as concentrações do óleo essencial de  
228 cravo e de seu componente químico majoritário, o acetato de eugenol (Sigma-Aldrich Brasil  
229 Ltda.). Foram feitas diluições em série, partindo da menor concentração que apresentou  
230 controle eficiente *in vitro* e em casa de vegetação, 0,14 % (v/v). Assim adicionou-se em  
231 sequência, em cada poço; 0,14 µL, 0,07 µL, 0,035 µL, 0,015 µL e 0,00 µL. Em seguida,  
232 foram adicionados em cada poço 10 µL da solução de cloreto de trifeniltetrazólio a 1 % (v/v)  
233 e observada a mudança de coloração de branco para róseo em células vivas da bactéria. O

234 experimento teve delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos, representados  
235 pelo óleo essencial de cravo e acetato de eugenol em cinco concentrações incluindo as  
236 testemunhas (0,00 µL), com quatro repetições, cada uma representada por um poço. O  
237 experimento foi realizado três vezes.

238

239 **Efeito da biofumigação com óleo essencial de cravo e seu composto bioativo (acetato de**  
240 **eugenol), em solo infestado com *R. solanacearum*, sobre a população bacteriana,**  
241 **componentes de resistência à murcha bacteriana e crescimento das plantas de tomateiro**

242

243 O acetato de eugenol foi adicionado ao solo autoclavado e previamente infestado com a  
244 bactéria conforme metodologia já descrita. Foram realizados os seguintes tratamentos: T1-  
245 acetato de eugenol a 0,07 %; T2- acetato de eugenol a 0,14 %; T3- óleo de cravo a 0,035 %;  
246 T4- óleo de cravo a 0,07 %; T5- óleo de cravo a 0,14 %; Testemunha - solo infestado + tween.  
247 Foram retiradas amostras antes dos tratamentos e sete dias após, para avaliação da população  
248 de *Rs*, conforme metodologia já descrita. Mudanças de tomateiro híbrido ‘TY 2006’, com 21 dias  
249 foram transplantadas para os solos tratados utilizando-se vasos plásticos com capacidade para  
250 250 mL. As plantas foram avaliadas diariamente durante 15 dias quanto aos componentes de  
251 resistência da murcha bacteriana, e aos 15 dias, quanto aos dados de crescimento: altura da  
252 planta, biomassa fresca e biomassa seca, conforme metodologia já descrita. O experimento  
253 teve delineamento inteiramente casualizado com os seis tratamentos descritos acima. Cada  
254 tratamento teve cinco repetições, cada uma com quatro plantas.

255

256 **Análises estatísticas**

257

258 Todos os experimentos foram realizados duas vezes para determinar a consistência dos  
259 resultados, exceto o da concentração mínima inibitória que foi realizado três vezes.



260 Considerando que não houve diferenças entre eles ( $P \leq 0,05$ ), os dados foram avaliados como  
261 repetições no tempo. Os pressupostos para as análises de variância (ANOVA) foram  
262 verificados usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene com auxílio do programa Statistix 9.0  
263 (Florida State University). As médias foram comparadas pelos testes T de Student (população  
264 bacteriana, características químicas do solo) e LSD (componentes de resistência à murcha  
265 bacteriana e variáveis de crescimento das plantas) com auxílio do programa Statistix 9.0.

266

267

## 268 **Resultados**

269

### 270 **Sensibilidade *in vitro* de *R. solanacearum* aos óleos essenciais**

271

272 Os óleos essenciais de melaleuca a 1 %, alecrim e citronela a 0,5 % e cravo, capim limão,  
273 eucalipto e palmarosa a 0,14 %, inibiram completamente o crescimento de *Rs* ( $P \leq 0,05$ ), após  
274 72 h de incubação a 28 °C. Já os óleos essenciais de gengibre a 1 % e bergamota, laranja doce  
275 e sálvia a 0,14 %, não inibiram significativamente o crescimento bacteriano em relação à  
276 testemunha (Tabela 1).

277

### 278 **População de *R. solanacearum* em solos biofumigados com óleos essenciais**

279

280 A biofumigação com os óleos essenciais de alecrim, cravo, capim limão, gengibre, melaleuca  
281 e palmarosa reduziu significativamente ( $P \leq 0,05$ ) a população de *Rs* no solo, aos sete dias após  
282 aplicação. Os óleos essenciais de alecrim e cravo destacaram-se por reduzir a população (log  
283 (UFC/mL +1)) de *Rs* de 9,15 para 6,90 (24,6 %) e de 9,07 para 1,66 (81,6 %),  
284 respectivamente. No entanto, os solos biofumigados com os óleos essenciais de bergamota,

285 citronela, eucalipto e laranja doce não apresentaram redução da população de *Rs* no solo  
286 (Figura 1).

287

### 288 **Características químicas do solo biofumigado com os óleos essenciais**

289

290 A biofumigação com os óleos essenciais não alterou significativamente ( $P \leq 0,05$ ) o pH inicial  
291 do solo (6,81) após quatro e sete dias (médias de 6,5 e 6,4), respectivamente. Os níveis de  
292  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , P, N,  $\text{Al}^{+3}$  e  $\text{H}^+ + \text{Al}^{+3}$  também não sofreram alterações após a  
293 biofumigação com os óleos essenciais (dados não apresentados).

294

### 295 **Componentes de resistência à murcha bacteriana em plantas de tomateiro cultivadas em** 296 **solo biofumigado com óleos essenciais**

297

298 A biofumigação com o óleo essencial de cravo reduziu significativamente ( $P \leq 0,05$ ) a murcha  
299 bacteriana em tomateiro, aumentando o  $\text{PL}_{50}$  para 16 dias, além de reduzir significativamente  
300 a INC, IMB e AACPD para 7,50, 1,87 e 0,50, respectivamente, com relação a testemunha  
301 (Tabela 2). O óleo de cravo não diferiu significativamente dos óleos de alecrim na INC, IMB  
302 e AACPD, bem como de melaleuca, na INC,  $\text{PL}_{50}$  e IMB. No entanto, estes óleos também não  
303 diferiram significativamente das testemunhas tween e relativa quanto à INC. Estas  
304 testemunhas apresentaram, respectivamente, 77,50 e 77,0 % de INC; 61,80 e 57,50 de IMB; e  
305 41,30 e 46,70 de AACPD.

306

### 307 **Crescimento de plantas de tomateiro em solo biofumigado com óleos essenciais**

308

309 As plantas cultivadas em solo biofumigado com óleo de cravo apresentaram os maiores  
310 índices de desenvolvimento ( $P \leq 0,05$ ) para as variáveis altura, biomassa fresca e biomassa

311 seca, analisadas aos 15 dias de cultivo (Tabela 3). Diferiram significativamente do tween e da  
312 testemunha relativa, não diferindo da testemunha absoluta (plantas cultivadas em solo sem *R.*  
313 *solanacearum*). A biomassa fresca também foi significativamente aumentada em plantas  
314 cultivadas em solo biofumigado com óleo de capim limão (1,53 g), palmarosa (1,56 g) e  
315 alecrim (1,71 g), quando comparados com tween (0,54 g) e testemunha relativa (0,57 g). A  
316 biomassa seca das plantas no tratamento com óleo de palmarosa (1,05 g) não diferiu do  
317 tratamento com o óleo de cravo nem da testemunha absoluta.

318

### 319 **Composição química do óleo essencial de cravo**

320

321 A análise da composição química do óleo essencial de cravo revelou o eugenol como  
322 constituinte majoritário (87 %), além de outras moléculas como:  $\beta$ -cariofileno (10 %),  $\alpha$ -  
323 humuleno (2 %),  $\delta$ -cadineno (0,40 %) e óxido de cariofileno (0,60 %) (Tabela 4). A análise de  
324 CG/DIC resultou em um cromatograma com eugenol apresentando os maiores picos (Fig. 2,  
325 Tabela 4).

326

### 327 **Atividade bactericida e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do óleo** 328 **essencial de cravo e seu componente bioativo (acetato de eugenol) sobre *R. solanacearum***

329

330 O óleo essencial de cravo e o acetato de eugenol apresentaram diferenças quanto a  
331 concentração mínima para inibição do crescimento bacteriano de *Rs* (Tabela 5). O óleo  
332 essencial de cravo promoveu inibição total a partir de 0,035 % (v/v), enquanto que o seu  
333 componente bioativo, apenas a partir da concentração de 0,07 % (v/v).

334

335 **Efeito da biofumigação com óleo essencial de cravo e seu composto bioativo (acetato de**  
336 **eugenol), em solo infestado com *R. solanacearum*, sobre a população bacteriana,**  
337 **componentes de resistência à murcha bacteriana e crescimento das plantas de tomateiro**

338

339 A população de *Rs* nos solos biofumigados com o óleo de cravo e acetato de eugenol foi  
340 inibida totalmente, em todas as concentrações testadas. Na testemunha relativa, a população  
341 de *Rs* aumentou significativamente ( $P \leq 0,05$ ) de 47 para 59 log (UFC/mL + 1), sete dias após  
342 o tratamento (dados não apresentados).

343 As plantas cultivadas nos solos biofumigados com o óleo essencial de cravo e o acetato de  
344 eugenol não apresentaram sintomas da murcha bacteriana em nenhuma das concentrações  
345 analisadas, diferindo significativamente da testemunha que apresentou INC (100 %), PL<sub>50</sub>  
346 (8,0), IMB (62,8) e AACPD (6,5).

347 As plantas também apresentaram crescimento significativamente maior que a testemunha em  
348 todas as variáveis analisadas e em todas as concentrações testadas, com exceção da BFR no  
349 tratamento com o óleo de cravo a 0,14 % (Tabela 6).

350

351 **Discussão**

352

353 A ação bactericida dos óleos de cravo, melaleuca, citronela, capim limão, eucalipto e  
354 palmarosa sobre *Rs in vitro*, pode estar relacionada aos complexos constituintes químicos que  
355 os óleos essenciais possuem, com mais de 100 diferentes componentes terpênicos e que  
356 através de uma ação sinérgica podem apresentar amplo espectro de ação (Tiwari et al. 2009).

357 O efeito desses óleos sobre *Rs* já foi relatado em diversos trabalhos e com isolados de  
358 diferentes hospedeiros. Os óleos de palmarosa e capim limão inibiram o crescimento *in vitro*  
359 de *Rs* patogênica ao gengibre em todas as concentrações testadas (Paret et al. 2010), enquanto

360 que os óleos de cravo e citronela inibiram em 100% o crescimento de *Rs* isolados de  
361 bananeira (Amorim et al. 2011).

362 Já com relação à *Rs* em tomateiro, a atividade bactericida do óleo de cravo foi evidenciada,  
363 mostrando ainda, na concentração de 0,5 % um amplo espectro de ação para outras bactérias  
364 fitopatogênicas a tomateiro e gerânio: Gram negativas (*Rhizobium rhizobacter* (Beijerinck  
365 and van Delden) Young et al. – sin. *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn;  
366 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al. – sin. *Erwinia*  
367 *carotovora* pv. *carotovora* (Jones) Dye e *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (Brown)  
368 Vauterin et al. – sin. *X. campestris* pv. *pelargonii* (Brown) Vauterin et al. e Gram positivas  
369 (*Streptomyces* spp. e *Rhodococcus fascians* (Tilford) Goodfellow) (Huang e Lakhsman 2010).

370 Outros óleos essenciais têm tido eficiência de controle nesse patossistema. O óleo de tomilho  
371 (*Thymus vulgaris* L.) e tomilho + hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.) reduziram a murcha  
372 bacteriana do tomateiro no campo em dois anos, por, respectivamente 94,8 a 97,1 % e 89,5 a  
373 82,4 % (Abo-Elyousr et al. 2014).

374 O efeito bactericida do óleo de cravo a diferentes gêneros e espécies revela este óleo como  
375 uma importante ferramenta no manejo da murcha bacteriana, uma vez que *Rs* apresenta alta  
376 diversidade infraespecífica, ampla gama de hospedeiros e elevada capacidade de  
377 sobrevivência (Huang e Lakhsman 2010).

378 A redução da população de *Rs* no solo pelos óleos de gengibre, melaleuca, alecrim, capim  
379 limão, cravo, palmarosa e sálvia, possivelmente ocorreu em consequência da presença dos  
380 componentes voláteis desses óleos, que se difundiram no solo infestado durante a  
381 biofumigação, causando efeito deletério na população bacteriana. Os monoterpenos presentes  
382 nestes óleos podem desintegrar a membrana externa de bactérias Gram negativas, liberando  
383 lipopolissacarídeos e, conseqüentemente, gerando alterações na permeabilidade da membrana  
384 plasmática, resultando na morte da célula bacteriana (Knowes 2005).

385 O efeito biofumigante dos óleos essenciais de palmarosa a 0,14 % e capim limão a 0,7 % foi  
386 verificado sobre isolados de *Rs* em tomateiro e pimentão, respectivamente, tanto em casa de  
387 vegetação como em condições de campo (Paret et al. 2010, Alves et al. 2014). Da mesma  
388 forma, o óleo de cravo a 0,5% reduziu, a população de *Rs* isolados de tomate e gerânio em  
389 solo infestado, atenuando a incidência da murcha bacteriana e apresentando um controle de  
390 até 100% da doença (Huang e Lakhsman, 2010).

391 A biofumigação é uma técnica de desinfestação do solo através da adição de matéria orgânica  
392 ou óleos essenciais que liberam substâncias tóxicas aos patógenos (Baptista et al. 2006). No  
393 presente trabalho, a efetividade na supressão de *Rs* no solo, deve-se possivelmente aos  
394 concentrados compostos voláteis presentes nestes óleos, tais como: citrol (capim limão),  
395 geraniol (palmarosa),  $\beta$ -citronelol (citronela),  $\alpha$ -terpineno (melaleuca) e eugenol (cravo), que  
396 podem atuar através de uma atividade lipofílica, agindo contra a membrana celular do micro-  
397 organismo, causando ruptura e alteração no transporte de moléculas, inibição da atividade  
398 enzimática e coagulação do conteúdo citoplasmático (Paret et al. 2012).

399 No entanto, a diminuição da população de *Rs* no solo constatada neste trabalho, apenas  
400 reduziu os componentes de resistência a murcha bacteriana em casa de vegetação, no  
401 tratamento com óleo de cravo, com menor incidência da doença (7,5 %) e maiores valores de  
402  $PL_{50}$ , (16,0 dias), o que resultou na redução do IMB (1,88) e AACPD (0,50). A efetividade da  
403 biofumigação com este óleo, no controle da murcha bacteriana em plantas já havia sido citada  
404 em bananeira (Amorim et al. 2011) e em tomateiro e gerânio (Huang e Lakshaman 2010). Os  
405 autores atribuem a eficiência do óleo essencial de cravo no controle da murcha bacteriana ao  
406 eugenol, seu principal componente químico.

407 Os efeitos da biofumigação com os óleos essenciais sobre o pH do solo e de seus micro e  
408 macronutrientes foram promissores, uma vez que não houve alterações significativas dessas  
409 variáveis do solo. Além disso, plantas cultivadas no solo biofumigado com os óleos essenciais  
410 de cravo e palmarosa apresentaram, significativamente, as maiores médias de biomassa

411 fresca, biomassa seca e altura, com resultados semelhantes à testemunha 2 (plantas cultivadas  
412 em solo sem infestação com *Rs* + ADE). Portanto, estes óleos não apresentam efeitos  
413 fitotóxicos ao tomateiro, confirmando os resultados encontrados por Huang e Laksman (2010)  
414 e Alves et al. (2014).

415 O óleo essencial de cravo apresentou como constituinte químico majoritário o fenilpropanóide  
416 acetato de eugenol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ), com pequenas quantidades de  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -  
417 cadideno e óxido de cariofileno, comprovando relatos anteriores (Chaieb et al. 2007;  
418 Abbaszadeh et al. 2015).

419 Os estudos com óleo essencial de cravo e seu componente químico majoritário, eugenol, tanto  
420 nos testes *in vitro*, quanto na biofumigação do solo, mostraram resultados semelhantes,  
421 demonstrando ser o eugenol, o principal constituinte químico responsável pela redução na  
422 população de *Rs in vitro*, no solo e no controle da murcha bacteriana do tomateiro em casa de  
423 vegetação, ou seja, pela ação bactericida do óleo.

424 Considerando-se que o óleo essencial de cravo a 0,14 % destacou-se como biofumigante e  
425 bactericida com ação direta contra *Rs* tanto *in vitro* quanto no solo, e foi capaz de reduzir a  
426 murcha bacteriana em casa de vegetação, conclui-se que a biofumigação com esse óleo é uma  
427 estratégia de controle com potencial para uso no manejo da murcha bacteriana do tomateiro.

428

#### 429 **Agradecimentos**

430

431 Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
432 (CAPES) pela bolsa de estudos concedida a MAGL e ao Conselho Nacional de  
433 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de produtividade em  
434 pesquisa concedidas a RLRM (309697/2011-5) e EBS.

435

436 **Referências**

437

438 Abo-Elyours KAM, Seleim MEA, Abd-El-Moneem KMH, Saeed FA (2014) Integrated effect  
439 of *Glomus mosseae* and selected plant oils on the control of bacterial wilt disease of  
440 tomato. Crop protection 66:67-71

441 Abbaszadeh SS, Sharifzadeh A, Shokri H, Krosravi AR, Abbaszadeh A (2015) Antifungal  
442 efficacy of thymol carvacrol, eugenol and menthol as alternative agentes to control the  
443 growth of food-relevant fungi. J. Med. Mycol 24:51-56

444 Alves AO, Santos MMB, Santos TCG, Souza EB, Mariano RLR (2014) Biofumigation with  
445 essential oils for managing bacterial wilt of sweet peppers. J Plant Pathol 96:363-367

446 Amorim EPR, Andrade WR, Moraes EM, Silva JC, Lima RS, Lemos EEP (2011)  
447 Antibacterial activity of essential oils and extractions of the development of *Ralstonia*  
448 *solanacearum* in banana seedlings. Rev Bras Frutic Ed. Especial: 392-398

449 Baptista M, Souza RB, Pereira W, Lopes CA, Carrijo, AO (2006) Efeito da solarização e  
450 biofumigação na incidência da murcha bacteriana em tomateiro no campo. Horti Bras  
451 27:161-165

452 Cardoso SC, Soares ACF, Brito AS, Santos AP, Laranjeira FF, Carvalho LA (2012)  
453 Evaluation of tomato rootstocks and its use to control bacterial wilt disease. Semina:  
454 Cienc Agrar 33:595-604

455 Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A  
456 (2007) The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia*  
457 *caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. Phytother Res  
458 21:501-506

459 Elphinstone JG, Hennessy J, Wilson JK, Stead DE (1996) Sensitivity of different methods for  
460 the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. European and  
461 Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin 26.



- 462 Engelbrecht MC (1994) Modification of a semi selective medium for isolation and  
463 quantification of *Pseudomonas solanacearum*. Bacterial Wilt Newsl 10:3-5
- 464 Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (1999) Manual de análise química  
465 dos solos, plantas e fertilizantes. 2<sup>nd</sup> Ed. Centro Nacional de Pesquisa do Solo, Rio de  
466 Janeiro
- 467 Garcia AL, Souza EB, Michereff SJ, Mariano RLR (2013) Characterization of *Ralstonia*  
468 *solanacearum* causing bacterial wilt in bell pepper in the state of Pernambuco, Brazil. J  
469 Plant Pathol 95:237-245
- 470 Fegan M, Prior P (2005) How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In:  
471 Allen C, Prior P, Hayward AC (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia*  
472 *solanacearum* species complex. APS Press, Saint Paul, pp 449-461
- 473 Ghareeb H, Bozsó Z, Ott PG, Repenning C, Sthal F, Wydra K (2011) Transcriptome of  
474 silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non  
475 accumulator tomato implicates priming effect. Physiol Mol Plant Pathol 75:83-89
- 476 Huang K, Lakshman DK (2010) Effect of clove oil on plant pathogenic bacteria and bacterial  
477 wilt of tomato and geranium. J Plant Pathol 92:701-707
- 478 Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony  
479 appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695
- 480 Knowles JR, Roller S, Murray DB, Naidu AS (2005) Antimicrobial action of carvacrol at  
481 different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and  
482 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Applied and Environmental Microbiology.  
483 71:797-803
- 484 Lopes CA, Ávila AC (2005) Doenças do tomateiro. 2<sup>nd</sup> Ed. Embrapa Hortaliças, Brasília
- 485 McKinney HH (1923) Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat  
486 seedlings by *Helminthosporium sativum*. J Agric Res 26:195-217

- 487 Malavolta Júnior VA, Beriam LOS, Almeida IMG, Rodrigues Neto J, Robbs CF (2008)  
488 Bactérias fitopatogênicas no Brasil: uma atualização. *Summa Phytopathol* 34:1-88
- 489 Nielsen LW, Haynes F (1960) Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas*  
490 *solanacearum*. *Am Potato J* 37:260-267
- 491 Opina N, Tavner F, Holloway G, Wang JF, Li TH, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC,  
492 Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW, Timmis JN (1997) A novel method for  
493 development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for  
494 identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia-*  
495 *Pac J Mol Biol Biotech* 5:19-30
- 496 Paret ML, Cabos R, Kratky BA, Alvarez AM (2010) Effect of plant essential oils on  
497 *Ralstonia solanacearum* Race 4 and bacterial wilt of edible ginger. *Plant Dis* 94:521-  
498 527
- 499 Paret ML, Sharma SK, Alvarez AM (2012) Characterization of biofumigated *Ralstonia*  
500 *solanacearum* cells using Micro-Raman Spectroscopy and electron microscopy.  
501 *Phytopathology* 102:105-113
- 502 Rocha DJA, Moura AB (2013) Controle biológico da murcha do tomateiro causada por  
503 *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias.  
504 *Trop Plant Pathol* 38:423-420
- 505 Roskopf EM, Chelleni DO, Kokalis-Burelle N, Church GT (2005) Alternative to methyl  
506 bromide: A Florida perspective. *Plant Health Prog* doi:10.1094/PHP-2005-1027-01-RV
- 507 Safni I, Cleenwerck I, Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U (2014) Polyphasic taxonomic  
508 revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: Proposal to emend the  
509 descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R.*  
510 *syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum*  
511 phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood  
512 disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R.*

- 513 *solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. Int  
514 J Syst Evol Microbiol 64:3087-3103
- 515 Santos MM, Peixoto AR, Pessoa SE, Nepa HBS, Da Paz CD, Souza AVV (2014) Estudos dos  
516 constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lipia gracilis* a  
517 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* “*in vitro*”. Summa Phytopathol 40:277-280
- 518 Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-  
519 mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67:1051-1056
- 520 Silveira EB, Gomes AMA, Ferraz E, Maranhão EAA, Mariano RLR (1999) Identification of  
521 tomato progenies for resistance to bacterial wilt. Horti Bras 17: 6-10
- 522 Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnell CP, Muthukumarappan K, Bouke P, Cullen PJ  
523 (2009) Application of natural antimicrobials for food preservation. J Agric 57:5987-  
524 6000
- 525 Takatsu A, Lopes CA (1997) Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e  
526 perspectivas de controle. Horti Bras 15:170-177
- 527
- 528

529 **Tabela 1** Sensibilidade *in vitro* de *R. solanacearum* a óleos essenciais, avaliada pelo  
 530 crescimento em meio de cultura NYDA durante 72 h a 28 °C

Tratamento/ (Concentração %)	Nome Científico	Log (UFC/ml+1)
Testemunha	-	8,77a
Gengibre (1,00)	<i>Zingiber officinalis</i>	8,62a
Bergamota (0,14)	<i>Citrus aurantium</i> var. <i>bergamia</i>	8,61a
Laranja doce (0,14)	<i>Citrus sinensis</i>	8,61a
Sálvia (0,14)	<i>Salvia sclarea</i>	8,41a
Alecrim (0,50)	<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,00b
Cravo (0,14)	<i>Caryophyllus aromaticus</i>	0,00b
Citronela (0,50)	<i>Cymbopogon nardus</i>	0,00b
Capim Limão (0,14)	<i>Cymbopogon citratus</i>	0,00b
Eucalipto (0,14)	<i>Eucaliptus citriodora</i>	0,00b
Melaleuca (1,00)	<i>Melaleuca alternifolia</i>	0,00b
Palmarosa (0,14)	<i>Cymbopogon martini</i>	0,00b

531 Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o

532 teste LSD

533

534

535

536

537

538

539 **Tabela 2** Efeito da biofumigação do solo com óleos essenciais nos componentes de  
 540 resistência à murcha bacteriana em plantas de tomateiro híbrido ‘TY 2006’, em casa de  
 541 vegetação

Tratamento/ (Concentração %)	INC <sup>a</sup> (%)	PL <sub>50</sub> <sup>b</sup>	IMB <sup>c</sup>	AACPD <sup>d</sup>
Tween	77,50 ab <sup>e</sup>	5,90cd	61,80ab	41,30a
Testemunha relativa	77,00ab	6,00cd	57,50abc	46,70a
Laranja doce (0,14)	95,00a	8,10cd	71,25a	44,50a
Eucalipto (0,14)	82,50ab	7,60cd	65,00ab	43,00ab
Citronela (0,5)	87,50a	8,60cd	62,50ab	35,60ab
Gengibre (1,0)	77,50ab	9,10c	45,62cd	32,70abc
Sálvia (0,14)	75,00ab	9,00cd	52,50bc	32,40ab
Bergamota (0,14)	45,00 ab	6,60d	53,13bc	37,90ab
Palmarosa (0,14)	42,50abc	13,00b	30,00de	15,40bcd
Capim limão (0,14)	45,00abc	13,60b	21,52e	8,80cd
Melaleuca (1,0)	30,20bc	14,60ab	15,00ef	23,60abc
Alecrim (0,5)	27,50bc	12,70b	20,63f	6,40cd
Cravo (0,14)	7,50c	16,00a	1,87f	0,50d

542 <sup>a</sup> Incidência (INC), porcentagem de plantas infectadas em relação ao total de plantas  
 543 inoculadas; <sup>b</sup> Período de latência (PL<sub>50</sub>), número de dias requeridos para o aparecimento de  
 544 murcha em 50 % das plantas inoculadas (Silveira et al. 1999); <sup>c</sup> índice de murcha bacteriana  
 545 (IMB) aos 15 dias, calculado conforme McKinney (1923); <sup>d</sup> área abaixo da curva de progresso  
 546 da doença (AACPD) (Shaner e Finney 1977). <sup>e</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna  
 547 não diferem entre si ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste LSD

548

549

550 **Tabela 3** Efeito da biofumigação do solo com óleos essenciais no desenvolvimento de plantas  
 551 de tomateiro híbrido ‘TY 2006’ em casa de vegetação

Tratamento (%)	Altura (cm)	Biomassa Fresca (g)	Biomassa seca (g)
Tween	5,20c <sup>a</sup>	0,54d	0,23g
Testemunha relativa	5,20c	0,57d	0,39fg
Testemunha absoluta	11,80ab	2,44a	1,32a
Capim limão (0,14)	12,40a	1,53abc	0,97bcd
Melaleuca (1,0)	12,20a	1,37abcd	0,91bcd
Palmarosa (0,14)	12,30a	1,56abc	1,05abc
Cravo (0,14)	11,80a	1,97ab	1,19ab
Alecrim (0,5)	11,60ab	1,71abc	0,89cde
Bergamota (0,14)	7,90abc	0,70d	0,27g
Sálvia (0,14)	6,40bc	0,71cd	0,36fg
Gengibre (1,0)	5,90c	0,84cd	0,60ef
Citronela (0,5)	5,70c	1,04bcd	0,85cde
Laranja doce (0,14)	5,60c	1,05bcd	0,30fg
Eucalipto (0,14)	5,60c	0,86cd	0,73de

552 <sup>a</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o  
 553 teste LSD

554

555

556

557

558

559 **Tabela 4** Identificação e quantificação da composição química do óleo essencial de cravo  
 560 caracterizados por Cromatografia gasosa e espectro de massa (CG/EM) e Cromatografia  
 561 gasosa e deionização em chama (CG/DIC) respectivamente

Constituinte	IK <sub>lit</sub> <sup>a</sup>	IK <sub>calc</sub> <sup>b</sup>	1a (%)	1b (%)	2a (%)	2b (%)	Média
Eugenol	1359	1363	87,0	87,0	87,2	86,9	87,0
$\beta$ -cariofileno	1419	1422	10,0	9,9	9,9	10,2	10,0
$\alpha$ -humuleno	1454	1460	2,1	2,2	1,9	1,9	2,0
$\delta$ -cadineno	1523	1527	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
Óxido de cariofileno	1583	1590	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

562 <sup>a</sup> IK<sub>lit</sub>= índice de Kovats da literatura.

563 <sup>b</sup>IK<sub>calc</sub> = índice de Kovats calculado

564

565

566 **Tabela 5** Concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial de cravo e seu componente  
 567 bioativo (acetato de eugenol) para o crescimento in vitro de *R. solanacearum*

Concentração % (v/v)	Óleo de cravo	Acetato de eugenol
0,14	IT <sup>a</sup>	IT
0,07	IT	IT
0,035	IT	SI <sup>b</sup>
0,008	SI	SI
Testemunha	SI	SI

568 <sup>a</sup> IT - Inibição total do crescimento bacteriano

569 <sup>b</sup>SI - Sem inibição do crescimento bacteriano

570

571

572

573 **Tabela 6** Efeito da biofumigação do solo com óleo essencial de cravo e seu composto  
 574 bioativo (acetato de eugenol) no desenvolvimento de plantas de tomateiro híbrido 'TY 2006'  
 575 em casa de vegetação

Tratamento	Altura (cm)	Biomassa fresca (g)	Biomassa seca (g)
Testemunha	5,72b <sup>a</sup>	1,59b	0,59b
Eugenol (0,07 %)	16,30a	5,99a	3,70a
Eugenol (0,14 %)	16,80a	6,24a	3,15a
Cravo (0,035 %)	15,04a	6,16a	3,08a
Cravo (0,07 %)	16,01a	5,89a	3,40a
Cravo (0,14 %)	15,69a	6,07a	3,30a

576 <sup>a</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o  
 577 teste de LSD

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

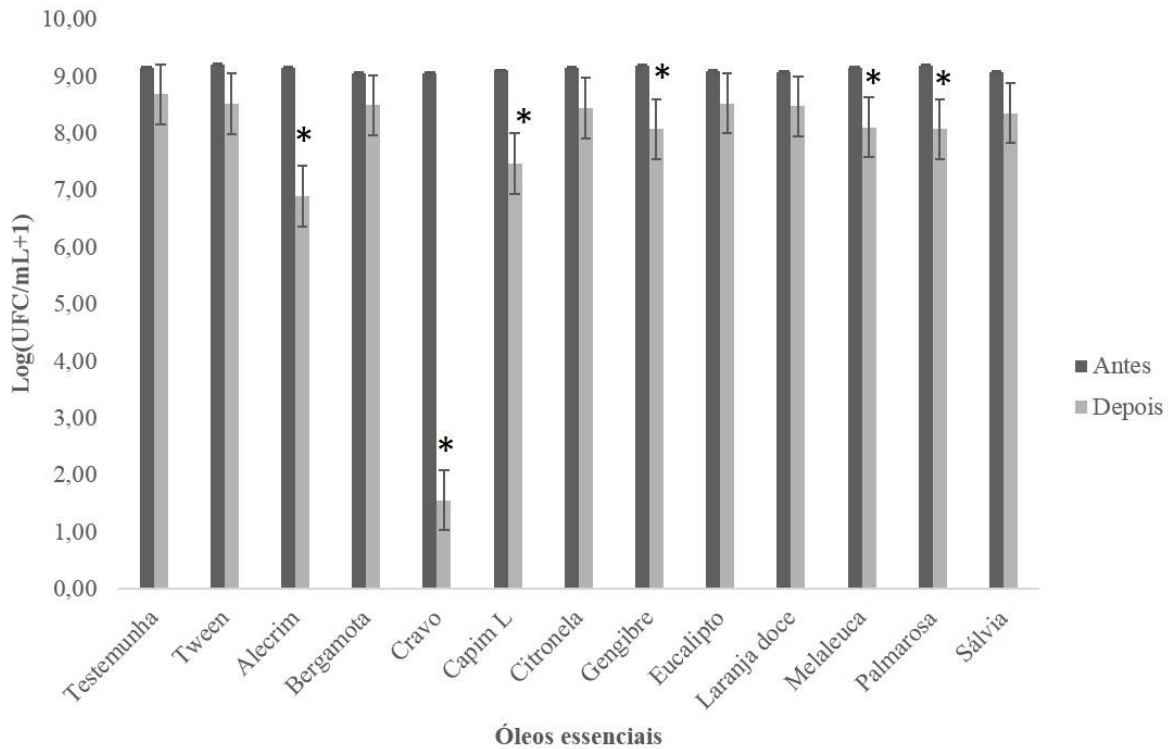
589

590

591

592





593

594 **Fig. 1** Efeito da biofumigação do solo com óleos essenciais sobre a população de *R.*  
 595 *solanacearum* antes (72 h após infestação do solo e sem aplicação dos óleos) e depois da  
 596 biofumigação do solo, avaliado pelo número de UFC/g de solo x 10<sup>8</sup> em meio de cultura  
 597 NYDA. Concentrações dos óleos: gengibre e melaleuca a 1,0 %, alecrim e citronela a 0,5 % e  
 598 os demais óleos a 0,14 % (v/v). Dados transformados para log. \*Médias que diferem  
 599 significativamente entre si pelo teste T de Student ( $P \leq 0,05$ ). As barras de erro representam o  
 600 desvio padrão das médias

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

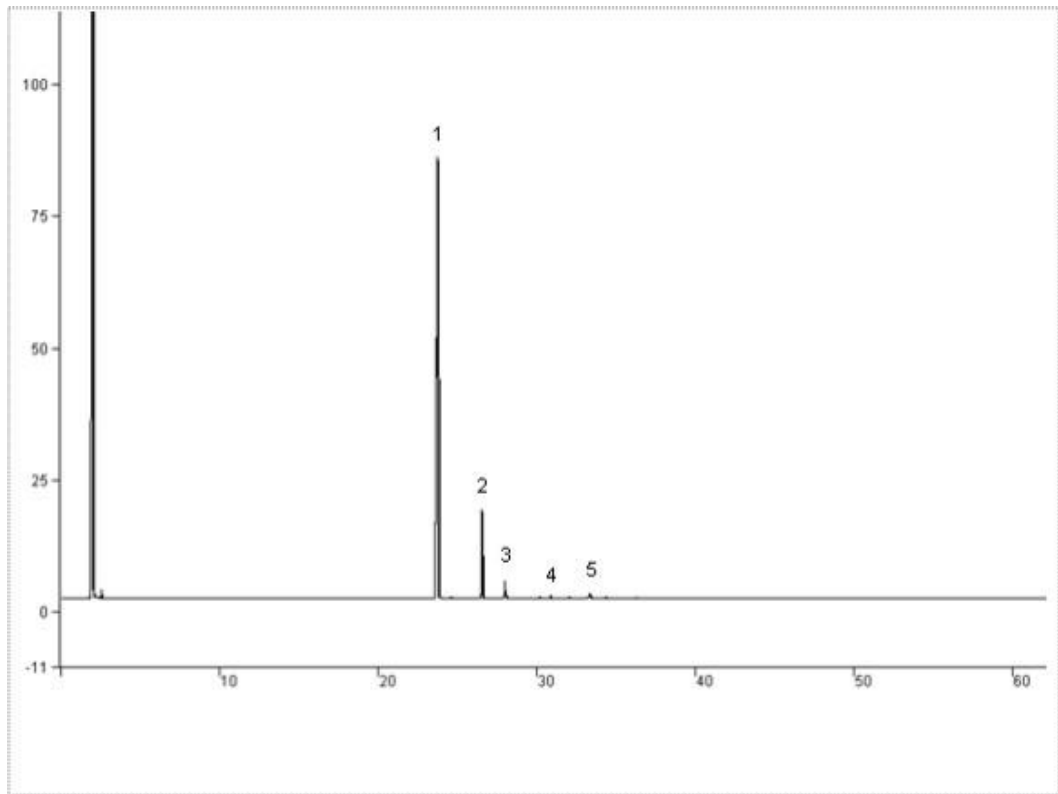
618

619

620

621

622

623 **Fig. 2** Cromatograma do óleo essencial de cravo em CG/DIC (Cromatografia gasosa e

624 deionização em chama), contendo Eugenol como padrão (primeiro pico à esquerda). 1.

625 eugenol, 2.  $\beta$ -cariofileno, 3.  $\alpha$ -humuleno, 4.  $\delta$ -cadineno e 5. óxido de cariofileno

626

627

628

629

630

631

632

**CAPÍTULO III**

---

**Silício no manejo da murcha bacteriana em três variedades de tomateiro**

## **Silício no manejo da murcha bacteriana em três variedades de tomateiro**

**Meridiana A. G. Lima<sup>1</sup> · Ana Rosa Peixoto<sup>2</sup> · Leonardo S. Cavalcanti<sup>4</sup> · Ivanildo Viana Borges<sup>4</sup>. Elineide B. Souza<sup>1</sup> · Rosa L. R. Mariano<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, 48900-000, Juazeiro, BA, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco

<sup>4</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil

**Autor para correspondência: Rosa L. R. Mariano, e-mail: rrmbac@gmail.com**

### **Resumo**

Foi avaliado o efeito da suplementação do silício (Si) na produção de mudas de tomateiro das cultivares (cvs.) Santa Clara, TY 2006 e Yoshimatsu 4-11, visando o manejo da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (*Rs*). As mudas das três cvs. foram produzidas em substrato sem silício (-Si) ou com 3 g de silicato de cálcio/kg de substrato (+Si) e transplantadas para solo com *Rs* (+*Rs*). Os componentes de resistência avaliados durante 15 dias foram incidência (INC) e severidade (SEV), calculando-se o índice de murcha bacteriana (IMB) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Aos 15 dias de cultivo, avaliou-se o crescimento das plantas, medindo-se a altura e o peso da biomassa fresca e seca, índice reativo de clorofila, conteúdo de Si nos tecidos foliares e população de *Rs* no caule. As atividades enzimáticas de fenilalanina amônia-liases (FAL),  $\beta$ -1,3 glucanases

(GLU) e peroxidases (POX) foram analisadas nas três cvs. produzidas em substrato (+Si) e (-Si) nos tempos: 0 h (uma hora antes do transplante), 24 h, 48 h, 72 h e 96 h depois do transplante. A suplementação com Si nas cvs. Santa Clara e TY 2006 promoveu redução da doença avaliada pela SEV (33,2 e 42 %), AACPD (23,1 e 19,2 %) e IMB (21,7 e 10 %), respectivamente. A suplementação com silício no substrato não afetou o crescimento das plantas, índice relativo de clorofila, o acúmulo de silício nos tecidos foliares e a população de *Rs* nos tecidos do caule. Foi evidenciada maior atividade enzimática de FAL e GLU em alguns tempos nas três cultivares. Desta forma, a produção de mudas de tomateiro em substrato com Si pode ser um componente no manejo da murcha bacteriana.

**Palavras-chave:** *Ralstonia solanacearum*. Silicato de cálcio. Substrato. Produção de mudas.

Controle

## Introdução

A murcha bacteriana é uma das doenças economicamente mais importantes na produção de solanáceas, em especial de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Wydra et al. 2005). A infestação do solo, substrato ou uso de mudas contaminadas com esta bactéria, pode causar prejuízos na produção das lavouras, com perdas de até 100%. Tomateiros infectados com *R. solanacearum* apresentam externamente murcha verde nas folhas jovens e epinastia foliar. Com a evolução da doença, em condições favoráveis, toda a planta murcha e sobrevém a morte (Malavolta Jr. et al. 2008).

Essa fitobacteriose é causada por um complexo de espécies de *Ralstonia*, principalmente *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. e *R. pseudosolanacearum* Safni et al., determinado por alta variabilidade genética, o que confere maior capacidade de adaptação a diferentes condições de ambiente e ampla gama de hospedeiros (Safni et al. 2014; Albuquerque et al.

2014). A infecção por este complexo provoca alterações fisiológicas irreversíveis às plantas hospedeiras, pois a patogenicidade está relacionada ao elaborado sistema de secreção Tipo III - SSTIII), com injeção de um complexo de proteínas efetoras que apresentam funções enzimáticas deletérias às células da planta (Jacobs et al. 2013). Em Pernambuco, já foram encontradas as duas espécies de *Ralstonia*, mas em tomateiros no Submédio do Vale do São Francisco, a espécie *R. solanacearum* tem sido a única isolada, justificando a sua utilização neste estudo.

No Brasil, a murcha bacteriana é endêmica. Não há agroquímicos registrados para seu controle, além da proibição do uso de fumigantes químicos no solo, ficando assim, o manejo limitado ao uso de medidas de exclusão e cultivo de variedades tolerantes. A cultivar Yoshimatsu 4-11 criada pelo Dr. Hiroshi Noda (Noda et al. 1993) na Amazônia é considerada tolerante, mas não tem grande expressão de cultivo em outras regiões do Brasil. Já a cv. TY 2006 tem sido considerada medianamente tolerante pelos produtores de tomate do Submédio do Vale do São Francisco, o que foi confirmado em experimentos preliminares a este trabalho. No entanto, a resistência genética em tomateiro a *R. solanacearum*, embora seja controlada por vários genes, pode não apresentar efetividade no manejo da doença, quando utilizada isoladamente, em função da plasticidade genética da bactéria e das alterações fenotípicas aleatórias das variedades (Lebeau et al. 2011).

Pesquisas com estudos bioquímicos e moleculares apontam o silício como um importante ativador da expressão e estabilidade de genes de resistência a diversos patógenos em plantas de tomateiro, sobretudo no patossistema envolvendo *R. solanacearum* (Ghareeb et al. 2011; Andrade et al. 2013). O incremento de silício no solo ou substrato, pode potencializar a resistência genética, mesmo em espécies não acumuladoras de silício, como tomateiro (Wydra et al., 2005) e pimentão (Alves et al. 2015).

O incremento de silício no solo ou substrato, pode potencializar a resistência genética, mesmo em plantas não acumuladoras de silício, como plantas de tomateiro (Wydra et al., 2005).

O silício é um elemento multifuncional que pode incrementar significativamente a tolerância de plantas a metais pesados, estresse hídrico, salino e ataque de patógenos (Liang et al. 2005). O aumento nos níveis de tolerância nas plantas promovidos pelo silício envolve mecanismos bioquímicos e moleculares nos quais os polímeros de óxido de silício (SiO<sub>4</sub>), que se acumulam na parede celular, atuam como mediadores de rotas metabólicas específicas na ativação de sinais moleculares para atividade de enzimas antioxidantes (Wang et al. 2013). O incremento de silício na produção de tomateiro envolvendo a resistência contra a *R. solanacearum* foi efetivo na transcrição de sinais para regulação e expressão de genes que ativam as proteínas de resistência β-1,3 glucanases, peroxidases, fenilalanina amonialisases e lipoxigenases. Estas proteínas são compostos metabólicos secundários produzidos pela planta com ação antimicrobiana, capazes de inibir ou retardar o ataque dos patógenos (Silva et al. 2007; Ghareeb et al. 2011; Borges et al. 2013). Neste contexto, a suplementação de substratos ou solos com silício na produção de mudas de tomateiro pode representar uma alternativa no manejo da murcha bacteriana através da ativação de respostas de defesa contra *R. solanacearum*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com silício na produção de mudas de tomateiro das cultivares Santa Clara, TY 2006 e Yoshimatsu, visando o manejo da murcha bacteriana.

## **Material e Métodos**

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Fitopatologia, Fisiologia Vegetal e casa de vegetação da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), localizada no município de Juazeiro-BA, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS).

### **Isolado, preparo do inóculo e infestação do solo**

O isolado de *Ralstonia solanacearum* UNEB01 (*Rs*) utilizado foi obtido de tomateiro com sintomas severos da murcha bacteriana, proveniente de uma área produtora no município de Petrolina-PE (S 09° 03' 312"W 040° 22' 38,7"). A patogenicidade foi confirmada realizando-se os postulados de Koch em plantas de tomateiro da cultivar Santa Clara. O isolado *Rs* foi identificado e caracterizado utilizando-se a técnica de PCR multiplex (Pmx-PCR) com os primers Nmult:21:1F, Nmult:21:2F, Nmult:23:AF, Nmult:22:InF, Nmult:22:RR, 759 e 760 (Fegan e Prior 2005; Opina et al. 1997; Safni et al. 2014).

A suspensão bacteriana utilizada nos experimentos foi preparada a partir do cultivo de *Rs*, em meio tetracloreto de trifenil tetrazólio (TZC) (Kelman, 1994) por 48 h a 28 °C. Colônias mucoides, irregulares e de coloração branca, foram transferidas para água destilada esterilizada (ADE) e a concentração da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro Analyser 500 (Analyser) para  $5 \times 10^8$  UFC/ml.

O solo utilizado nos experimentos foi coletado no campus da UNEB- DTCS e, submetido à análise química (Embrapa, 1999) apresentou as seguintes características: pH em água = 6,81;  $\text{Ca}^{+2} = 4,30 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Mg}^{+2} = 1,10 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Na}^+ = 0,10 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{K}^+ = 0,51 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{P}^{+3} = 44,53 \text{ mg dm}^{-3}$ ;  $\text{N}^+ = 0,99 \text{ g Kg}^{-1}$ ;  $\text{Al}^{+3} = 0,00 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{H}^+ + \text{Al}^{+3} = 0,00$ ; MO = 0,65 %;  $\text{S}_b = 6,01 \text{ mg dm}^{-3}$ ; T = 6,01 mg dm<sup>-3</sup>; V = 100 %). Este solo foi misturado com areia (2:1) (v/v) e autoclavado por 2 h, sucessivamente, em intervalos de 24 horas, durante sete dias.

A suspensão bacteriana foi adicionada ao solo previamente autoclavado (40 mL/kg de solo), misturada uniformemente, incubando-se em bandejas de plástico cobertas com papel alumínio, por 72 h em bancada da casa de vegetação a  $28 \pm 2$  °C e  $80 \pm 2$  % de umidade relativa do ar.

### **Silício no substrato para produção de mudas de tomateiro**



Foram adicionados silicato de cálcio ( $\text{CaSiO}_3$ ), contendo 60% de óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) e 40% de óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ ) (Vetec Química Fina Ltda.). O silicato de cálcio foi incorporado na dose de 3g/kg de substrato comercial Tropstrat HT Hortaliças (Vida Verde Ltda.) e os teores de cálcio para os tratamentos sem adição do silício foram nivelados com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) contendo 40 % de cálcio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) para que a única fonte de variação fosse a adição de  $\text{SiO}_2$ . O substrato foi incubado em sacos plásticos transparentes em bancada de casa de vegetação, em temperatura ambiente ( $30\pm 2$  °C) com a umidade mantida pela adição de 100 ml de ADE/kg de substrato. Após 25 dias de incubação, o substrato tratado foi distribuído em bandejas de poliestireno e semeado com os tomateiros ‘Santa Clara’, ‘TY 2006’ e ‘Yoshimatsu 4-11’. Após 25 dias de cultivo, as plantas foram transplantadas para solo previamente infestado com *Rs*.

Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído de seis tratamentos com cinco repetições, representadas por quatro plantas cada. Os tratamentos constaram das três variedades de tomateiro semeadas em substrato com e sem silício (+Si e – Si).

### **Silício nas características químicas do substrato**

Foi utilizado o substrato comercial Tropstrat HT com a seguinte composição:  $\text{N}^+ = 5,80$ ;  $\text{P}^{+3} = 1,65$ ;  $\text{K}^+ = 14,50$ ;  $\text{Ca}^{+2} = 10,80$ ;  $\text{Mg}^{+2} = 10,50$ ;  $\text{C}^{+4} = 215$  (g/kg) e  $\text{B}^{+3} = 5,00$ ;  $\text{Cu}^{+2} = 4,00$ ;  $\text{Fe}^{+3} = 238,00$ ;  $\text{Mn}^{+2} = 169,00$ ;  $\text{Zn}^{+2} = 36,00$ ;  $\text{Na}^+ = 290,00$  (mg/kg) e pH em água = 6,20. O  $\text{SiO}_2$  foi incorporado ao substrato e após 25 dias foram determinados os teores de:  $\text{N}^+$ ,  $\text{P}^{+3}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{C}^{+4}$ ,  $\text{B}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Na}^+$ , bem como pH, teor de matéria orgânica e de umidade (Embrapa, 1999). Os teores de silício no substrato foram determinados pelo método do ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Korndörfer et al. 2004). Foram coletadas três

amostras simples de cada tratamento (-Si) e (+Si), e misturadas para constituição da amostra composta que foi dividida em quatro sub-amostras representando as repetições.

### **Silício nos componentes de resistência à murcha bacteriana, crescimento de tomateiros e teores de Si nas plantas**

As cultivares de tomateiro TY 2006 (Semini Ltda.), Santa Clara (Feltrin Ltda.) e Yoshimatsu 4-11 (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia) foram escolhidas pois a Santa Clara é padrão de susceptibilidade (Cardoso et al. 2012) e TY 2006 e Yoshimatsu 4-11, são consideradas, respectivamente, medianamente tolerante e tolerante (Noda et al., 1993) à murcha bacteriana.

As sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo substrato comercial Tropstrat HT Hortaliças com os tratamentos +Si e -Si e as plântulas cultivadas por 25 dias após emergência. As mudas foram então transplantadas para vasos plásticos de 300 ml contendo solo infestado (+Rs). A umidade do solo foi mantida em capacidade de campo através de irrigações diárias com adição de aproximadamente 200 ml de água/vaso.

Após o transplântio, as plantas foram cultivadas por 15 dias em condições de casa de vegetação com temperatura de  $28 \pm 2$  °C e  $80 \pm 2$  % de umidade relativa do ar. Foram realizadas avaliações diárias quanto à presença de sintomas característicos da murcha bacteriana, ou seja, incidência da doença (INC). A severidade (SEV) da doença foi avaliada a cada três dias com auxílio da escala de notas descritiva de 0 a 4 (Nielsen e Haynes 1960), onde 0 = ausência de sintomas, 1 = planta com 1/3 das folhas murchas, 2 = planta com 2/3 das folhas murchas, 3 = planta totalmente murcha e 4 = planta morta. Com os dados obtidos foram determinados os seguintes componentes de resistência da doença: índice de murcha bacteriana (IMB) aos 15 dias, calculado conforme McKinney (1923) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Shaner e Finney 1977). Ao final destas avaliações,

verificou-se o crescimento das plantas, medindo-se a altura (cm) e pesando-se a biomassa fresca e seca (g). Às plantas que morreram em consequência da murcha bacteriana foi atribuído o valor nulo para as variáveis analisadas. As medidas de altura foram obtidas com auxílio de uma fita métrica, com corte das plantas rente à superfície do substrato separando-se raízes da parte aérea. Após a pesagem para obtenção da biomassa fresca, as plantas foram colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa com circulação de ar forçado por 72 horas a 60 °C para pesagem da biomassa seca. A partir da biomassa seca também foi determinado os teores de Si nos tecidos foliares. O material foi triturado em moinho manual, pesado, armazenado em sacos de papel em temperatura ambiente e enviado para análise de silício no Laboratório de Solos da Universidade Federal de Uberlândia. O experimento em casa de vegetação teve delineamento inteiramente casualizado, constituído de seis tratamentos com cinco repetições com quatro plantas cada. Para determinação do conteúdo de Si nos tecidos foram analisadas quatro repetições, cada uma com 1g de matéria seca.

#### **Silício no índice reativo de clorofila**

Com auxílio de um medidor eletrônico de teor de clorofila, clorofilômetro portátil (ClorofilLog, Falker), foram realizadas três leituras do índice reativo de clorofila, aos cinco, dez e quinze dias após o transplântio. Foram analisadas ao acaso quatro folhas de cada planta. As leituras foram realizadas na ausência da luz solar para evitar a desativação de transportes fotossintéticos.

#### **População de *R. solanacearum* nos tecidos de plantas de tomateiro tratadas com silício**

Para quantificar a população de *Rs* no caule de plantas de tomateiro, foram retiradas ao acaso quatro amostras de caule de cada tratamento (considerando da base do caule até 5 cm acima).

Os tecidos foram pesados e tratados com álcool a 70 % e hipoclorito de sódio 1:3 (v/v) por 10 seg, sucessivamente. Em seguida, foram lavados em ADE por 60 seg e fragmentados para pesagem de 1 g da amostra. Adicionou-se à amostra 50 µL de ADE e a suspensão foi centrifugada por 20 min a 2.400 rpm. O pellet foi ressuspensionado em 1000 µL de ADE e a suspensão resultante diluída em série para até  $10^3$  UFC/ml. Daí foram retiradas alíquotas de 100 µL e espalhadas em placas de Petri contendo meio TZC, sendo utilizadas quatro placas por tratamento. Após incubação por 72 h a 28 °C, as colônias típicas de *Rs* por placa foram contadas e os valores convertidos em Log (UFC/ml +1). Para confirmação, a patogenicidade de algumas colônias foi testada em tomateiros da cv. Santa Clara.

### **Silício na atividade enzimática de plantas de tomateiro**

Para análise da atividade enzimática, foram realizadas coletas de tecido vegetal em cinco tempos: zero h (uma hora antes do transplante), 24 h, 48 h, 72 h e 96 h depois do transplante. Cada amostra constou de uma folha por planta, de cada repetição, em todos os tratamentos. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas, congeladas e armazenadas em freezer a -16 °C para realização das análises de fenilalanina amônia-liases (FAL, EC 4.3.1.24),  $\beta$ -1,3 glucanases (GLU, EC 3.2.1.39) e peroxidases (POX, EC 1.11.1). Para o preparo dos extratos enzimáticos, cada amostra foi pesada e triturada em almofariz sobre cuba de gelo (Guimarães et al. 2010). Na determinação da atividade das fenilalanina-amonioliasas, utilizou-se fenilalanina como substrato, cuja reação resulta na formação de ácido *trans*-cinâmico (Taiz e Zeiger, 2004), determinado segundo Umesha (2006), sendo a atividade lida em espectrofotômetro a 290 nm, comparada com padrões de ácido *trans*-cinâmico. A atividade das  $\beta$ -1,3-glucanases foi determinada conforme Guimarães et al. (2010), sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro a 480 nm e comparadas com padrões de glicose. A curva padrão de glicose utilizada foi constituída das seguintes

concentrações: 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/mL. A atividade das peroxidases foi realizada pela oxidação do guaiacol em tetraguaicol na presença do peróxido de hidrogênio (Zeraik et al. 2008), sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro a 480 nm.

### **Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados duas vezes para determinar a consistência dos resultados. Considerando que não houve diferenças entre eles ( $P \leq 0,05$ ), os dados foram avaliados como repetições no tempo. Os pressupostos para as análises de variância (ANOVA) foram verificados usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene com auxílio do programa Statistix 9.0). As médias foram comparadas pelo teste T de Student ( $P \leq 0,05$ ) para características químicas do substrato; componentes de resistência à murcha bacteriana; conteúdo de clorofila na parte aérea; conteúdo de Si na parte aérea; população de *Rs* no tecidos e atividade enzimática. O teste LSD ( $P \leq 0,05$ ) foi utilizado para os dados de crescimento das plantas. Toda a análise estatística foi feita com auxílio do programa Statistix 9.0.

## **Resultados**

### **Silício nas características químicas do substrato**

Vinte e cinco dias após a adição de Si ao substrato, o conteúdo de alguns nutrientes foi alterado significativamente ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 1).  $B^{+3}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  e  $Na^{+}$  tiveram acréscimos de 5,21 para 9,02, de 36,00 para 48,98, de 169,00 para 207 e de 260,98 para 290,00 mg/Kg de substrato, respectivamente. Os conteúdos de  $K^{+}$  e  $Cu^{+2}$  foram significativamente reduzidos de 15,35 para 14,50 e de 3,71 para 1,98 mg/Kg, respectivamente. Os demais nutrientes N, P,

Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup> e Fe<sup>+3</sup>, permaneceram inalterados, após a adição do silício. O pH do substrato foi significativamente elevado ( $P \leq 0,05$ ) pela adição de silício passando de 6,20 para 6,66 (Tabela 1).

### **Silício nos componentes de resistência à murcha bacteriana, crescimento de tomateiros e teores de Si nas plantas**

As avaliações realizadas 15 dias após a inoculação do patógeno evidenciaram que o silício não influenciou significativamente ( $P \leq 0,05$ ) a INC da murcha bacteriana em nenhuma das cultivares estudadas (Tabela 2). Notou-se que a cv. Yoshimatsu 4-11 apresentou uma INC baixa (2,5 %) e apenas nas plantas (Si-), por conseguinte, a SEV, AACPD e IMB foram também muito baixas e não diferiram do tratamento (Si+) que apresentou INC e demais variáveis com valor 0. Nas cultivares Santa Clara e TY 2006, a SEV, AACPD e IMB foram reduzidas ( $P \leq 0,05$ ) pelo tratamento com Si, exceto na AACPD da 'Santa Clara'. Nesta cultivar, a adição de Si, reduziu a SEV, AACPD e IMB em 33,2; 23,1 e 21,7 %, respectivamente. Na cv. TY 2006, a SEV, AACPD e IMB foram reduzidas em 42, 19,2 e 10%, respectivamente.

Quanto ao crescimento das plantas em casa de vegetação, aos 15 dias após a inoculação com *Rs*, não foram observadas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre plantas produzidas em substrato +Si e -Si, para nenhuma das variáveis fisiológicas analisadas (dados não apresentados). No entanto, a cultivar Yoshimatsu 4-11 apresentou altura, biomassa seca e teor de clorofila significativamente maiores ( $P \leq 0,05$ ), respectivamente, 18,6 cm, 2,41 g e 32,27 nm do que as cvs. Santa Clara e TY 2006 (Tabela 3).

A adição de silício ao substrato não promoveu alteração ( $P \leq 0,05$ ) no acúmulo de silício nos tecidos foliares em nenhuma das cultivares estudadas, com valores de no máximo 3,3 % (dados não apresentados).

### **População de *R. solanacearum* dos tecidos de plantas de tomateiro tratadas com silício**

A suplementação com silício no substrato não afetou de forma significativa ( $P \leq 0,05$ ) o número de colônias de *Rs* nos tecidos do caule das plantas das três cultivares analisadas (Fig. 1). Observou-se grande diferença entre as populações de *Rs* nas cvs. Santa Clara (suscetível) e TY 2006 (moderadamente tolerante) em relação à ‘Yoshimatsu 4-11’ (tolerante).

### **Silício na atividade enzimática das plantas de tomateiro**

Foi detectada atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase,  $\beta$  1,3-glucanase e peroxidase em todos os tratamentos e tempos analisados, no entanto só foram observados aumentos significativos ( $P \leq 0,05$ ) de atividade em função do tratamento com silício para as duas primeiras enzimas.

Houve aumento significativo ( $P \leq 0,05$ ) da atividade da fenilalanina-amonialiase nas três cultivares. Na ‘Santa Clara’ a maior atividade enzimática ocorreu apenas às 24 h após o transplântio em solo infestado (+*Rs*); na ‘TY 2006’ esta atividade foi detectada de 0 até às 48 h; enquanto que na ‘Yoshimatsu 4-11’ a expressão foi observada das 72 às 96 h (Fig. 2).

A atividade da  $\beta$  1,3-glucanase aumentou significativamente ( $P \leq 0,05$ ) na cultivar Santa Clara às 96 h; na ‘TY 2006’ às 72 h; e na ‘Yoshimatsu 4-11’ às 24 h, 72 e 96 h (Fig. 3).

### **Discussão**

A suplementação do substrato com Si aumentou os níveis dos micronutrientes B, Zn e Mn. Estes elementos são importantes para as plantas como cofatores de rotas metabólicas que envolvem a expressão e ativação de enzimas e constituintes da parede celular (Chen et al.

2014) e influenciam na ativação de respostas bioquímicas ao estresse biótico e abiótico (Marodin et al. 2014). Os resultados do presente trabalho confirmam que a incorporação do Si no substrato, eleva os teores de determinados nutrientes, como verificado por Alves et al. (2015) e Conceição et al. (2014).

O teor de  $\text{Na}^+$  teve um incremento de 10 % no substrato suplementado com Si, o que pode ser considerado vantajoso, embora, na nutrição mineral de plantas, o  $\text{Na}^+$  assim como o Si, não atendam aos critérios da essencialidade. No entanto, esses elementos podem ser benéficos às plantas, atuando na ativação enzimática da ATPase com funções importantes na osmorregulação, absorção de macronutrientes e permeabilidade das células (Korndorfer 2006; Inocêncio et al. 2014). O mesmo aconteceu para o pH do substrato (+Si) que foi significativamente elevado em 10,6 % o que constitui mais um efeito benéfico da adição do Si. O aumento do pH favorece uma maior disponibilização dos nutrientes diretamente envolvidos na ativação dos mecanismos de defesa das plantas (Epstein 1999; Ferreira et al., 2015).

Os únicos elementos analisados neste estudo que apresentaram redução significativa no substrato (+Si) foram o  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{K}^+$ . No entanto, essa redução pode ser atenuada, sobretudo pela elevação do pH para 6,60 que pode tornar os íons  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{P}^{+3}$  e  $\text{K}^+$  mais disponíveis às plantas. Também o  $\text{Na}^+$  pode substituir parcialmente o  $\text{K}^+$  na ativação da enzima ATPase (Korndorfer 2006; Inocêncio et al. 2014).

O efeito do Si na redução dos componentes de resistência à murcha bacteriana não foi observado na incidência da doença, mas sim na severidade, e foi variável para cada cultivar. A cv. Santa Clara apresentou a maior intensidade da doença, confirmando sua alta suscetibilidade, tanto em plantas produzidas em substrato (+Si) como (-Si). No entanto, nesta cultivar o efeito do Si foi verificado na redução da SEV e do IMB, indicando uma possível ação deste elemento na expressão de genes responsivos para a presença da bactéria (Ghareeb et al. 2011). Dannon e Wydra, (2004) e Diogo e Wydra (2007) também comprovaram o efeito



do Si na redução dos sintomas da murcha bacteriana em genótipos de tomateiro suscetível (L390) e moderadamente resistente (King Kong 2).

O Si também reduziu significativamente a severidade da murcha bacteriana (SEV, AACPD e IMB) na cv. TY 2006, considerada moderadamente tolerante a *Rs*. Isto pode ser explicado pelo fato de que o silício promove a expressão e estabilidade de genes de resistência (Ghareeb et al. 2011), podendo potencializar a tolerância da cultivar à doença. Neste mesmo patossistema, resultados semelhantes foram obtidos na Etiópia com a cultivar tolerante King Kong 2, que apresentou redução da murcha, quando produzida em substrato suplementado com Si (Ayana et al. 2005).

Plantas da cv. Yoshimatsu 4-11 praticamente não apresentaram sintomas típicos da doença, independente do tratamento, demonstrando um comportamento tolerante à inoculação com *Rs* e comprovando esta característica descrita em 1993 por Noda et al. (1993) e citada por Sousa et al. (2013).

Para as variáveis fisiológicas altura, biomassa seca e clorofila, não foi observada nenhuma interação significativa entre os tratamentos +Si e -Si. No entanto, houve interação significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre as cultivares. A ‘Yoshimatsu 4-11’ apresentou as maiores médias de altura, biomassa seca e espectro de clorofila, o que pode ser considerado mais um indicativo de um comportamento tolerante, uma vez que mesmo cultivadas em solo infestado com *Rs*, as plantas não apresentaram sinais de estresse fisiológico.

O teor de  $\text{SiO}_2$  nos tecidos não foi incrementado, independente da adição do Si ao substrato e cultivar. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que plantas de tomateiro são classificadas como não acumuladoras de Si. Segundo Marchner (1995) e Ma et al. (2001) plantas são consideradas acumuladoras quando apresentam em seu conteúdo de matéria fresca 1 a 3% de  $\text{SiO}_2$  e não acumuladoras quando este percentual é menor que 0,5%. Neste estudo, os valores do conteúdo de Si/g de matéria fresca foram abaixo de 0,5%. No entanto, não é

necessário grande acúmulo de Si, quando o mecanismo de redução da doença é a indução de resistência (Kurabachew e Wydra 2014).

A colonização por *Rs* nos tecidos das plantas não foi significativamente afetada pelo tratamento +Si em nenhuma das três cultivares, embora em trabalhos semelhantes, o Si tenha promovido a redução da população bacteriana nos tecidos (Wydra et al. 2005; Ayana et al. 2011). Foi observado que a ‘Yoshimatsu 4-11’ apresentou menor população de *Rs* em relação as demais cultivares, indicando haver uma tolerância a colonização por *Rs* em seus tecidos e consequentemente baixa intensidade da doença.

A suplementação com Si foi efetiva na ativação das enzimas FAL e GLU, variando mais uma vez de acordo com a cultivar estudada. O Si promoveu maior atividade enzimática da FAL com duração média de 48 horas na cv. TY 2006. Essa maior estabilidade na atividade enzimática da FAL promovida pelo Si pode ter sido suficiente para reduzir os sintomas da murcha bacteriana (He et al. 2013; Wang et al. 2013). O incremento na atividade de GLU verificado nas plantas (+Si) das três cultivares, também sugere uma possível relação entre o aumento na atividade desta enzima com a potencialização do efeito do Si na ativação dos mecanismos de defesa.

Diversos trabalhos correlacionaram a redução de doenças causadas por *Rs* à expressão das enzimas FAL, GLU e POX, como mecanismo de defesa vegetal (Ghareeb et al. 2011; Oliveira et al. 2012; Chen et al. 2014; Alves et al. 2015). Estas respostas de defesa na planta mediadas pelo Si, ocorrem a nível molecular (Ghareeb et al. 2011; Chen et al. 2014). Esses mecanismos envolvem o acúmulo de polímeros de óxido de silício ( $\text{SiO}_4$ ) na parede celular e a atuação como mediadores químicos em rotas metabólicas específicas na ativação de sinais moleculares para atividades de enzimas responsivas ao ataque de patógeno (Wang et al. 2013).

Análises proteômicas realizadas no patossistema tomateiro-*Rs*, identificaram 53 proteínas fortemente modificadas nas raízes das plantas inoculadas e tratadas com Si. Neste caso, o

papel do Si na proteção à murcha bacteriana, foi a modulação de proteínas não apenas do metabolismo energético, como também na resposta de defesa e tradução de sinais para biossíntese da atividade enzimática responsável pela indução de resistência nas plantas (Chen et al. 2014).

A suplementação de substrato comercial com 3g/Kg de silicato de cálcio reduziu a severidade da murcha bacteriana em tomateiros das cultivares Santa Clara e TY2006. O silício promoveu maior atividade das enzimas  $\beta$ -1,3 glucanase e fenilalanina-amonialiase, indicando atuação na indução de resistência a esta doença. Desta forma, a produção de mudas de tomateiro em substrato com Si pode constituir uma medida de controle a ser utilizada como componente no manejo da murcha bacteriana.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida a MAGL e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de produtividade em pesquisa concedidas a RLRM (309697/2011-5) e EBS.

### **Referências**

Albuquerque GMR, Santos LA, Félix KCS, Rollemberg CL, Silva AMF, Souza EB, Cellier G, Prior P, Mariano RLR (2014) Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brasil extend Know diversity in paraphyletic phylotype II. *Phytopatology* 104:1175-1182.

- Alves AO, Santos MMB, Souza EB, Mariano RLR (2015) Use of silicon for reducing the severity of bacterial wilt of sweet pepper. *Journal of plant pathology* 97:419-420.
- Andrade CCL, Resende RS, Rodrigues FA, Ferraz HG M, Moreira W R, Oliviera J R, Mariano RLR (2013) Silicon reduces bacterial speck development on tomato leaves. *Tropical Plant Pathology* 38:436-442.
- Ayana G, Fininsa C, Ahmed S, Wydra K (2011) Effect of soil amendment on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and tomato yields in Ethiopia. *Journal of Plant Protection Research* 51:72-76.
- Borges IV, Peixoto AR, Cavalcanti LS, Lima MAG, Silva MS (2013) Extrato de jurema preta no controle de mancha-de-alternaria em melancia. *Revista Caatinga* 26:36-45.
- Cardoso, SC ; Soares, A.C.F.; Brito, A.S.; Santos, A.P.; Laranjeira, F.F. ; Carvalho, L.A. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, n. 2, p. 595-604, 2012.
- Chen Y, Liu M, Wang L, Lin W, Fan X, Cai K (2014) Proteomic characterization of silicon-mediated resistance against *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Plant and Soil* 387:425-440.
- Conceição CS, Félix KCS, Medeiros EV, Mariano RLR, Souza EB (2014). Combined effect of yeast and silicon on the control of bacterial fruit blotch in melon. *Science Horticulturae* 174:164-170.

- Dannon E, Wydra K (2004) Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64:233-243.
- Diogo RVC, Wydra K (2007) Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polysaccharide structure. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70:120-129.
- Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (1999). Manual de análise química dos solos, plantas e fertilizantes. 2ª Ed. Rio de Janeiro, Brasil: Centro Nacional de Pesquisa do Solo.
- Epstein E (1999) Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:641-664.
- Fegan M, Prior P (2005) How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: Allen C, Prior P, Hayward AC (Eds.) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum* species complex. Saint Paul: APS Press pp. 449-461.
- Ferreira H A, Nascimento CWA, Datnoff LE, Nunes GHS, Preston W, Souza EB, Mariano RDLR (2015) Effects of silicon on resistance to bacterial fruit blotch and growth of melon. *Crop Protection* 78:277-283.
- Ghareeb H, Bozsó Z, Ott PG, Repenning C, Stahl F, Wydra K (2011) Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-

accumulator tomato implicates priming effect. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 75:83-89.

Guimarães LMP, Pedrosa EMR, Coelho RSB, Couto EF, Maranhão SRVL, Chaves A (2010) Eficiência e atividade enzimática elicitada por metil jasmonato e silicato de potássio em cana de açúcar parasitada por *Meloydogyne incognita*. *Summa Phytopathologica* 35:11-15.

Inocêncio MF, Carvalho JG, Furtini Neto AE (2014) Potássio, sódio e crescimento inicial de espécies florestais sob Substituição de potássio por sódio. *Revista Árvore* 38:113-123.

Jacobs JM, Milling A, Mitra RM, Hogan CS, Ailloud F, Prior P, Allen C (2013) *Ralstonia solanacearum* requires PopS, an ancient AvrE-family effector, for virulence and to overcome salicylic acid-mediated defenses during tomato pathogenesis. *American Society for Microbiology* 4: e00875-13.

Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.

Korndörfer GH (2006) Elementos benéficos. In: Fernandes MS (Ed.) *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa, Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, pp. 355-374.

Korndörfer GH, Pereira HS, Nolla A (2004) Análise de silício: solo, planta e fertilizante. *Boletim técnico* 2.

- Kurabachew H, Wydra K (2014) Induction of systemic resistance and defense-related enzymes after elicitation of resistance by rhizobacteria and silicon application against *Ralstonia solanacearum* in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Crop Protection* 57:1-7.
- Lebeau A, Daunay MC, Frary A, Palloix A, Wang JF, Distinguer F, Chiroleu F, Wicker E, Prior P (2011) Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resource respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101:164-165.
- Liang YC, Sun WC, SI J, Romheld V (2005) Effects of foliar and root applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. *Plant Pathology* 54:678-685.
- Ma JF, Miyake Y, Takahashi E (2001) Silicon as a beneficial element for crop plants. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH (Eds.). *Silicon in agriculture*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, pp. 17-39.
- Malavolta Jr VA, Beriam LOS, Almeida IMG, Rodrigues Neto J, Robbs CF (2008) Bactérias fitopatogênicas no Brasil: uma atualização. *Summa Phytopathologica* 34:1-88.
- Marodin JC, Resende JTV, Morales RGF, Silva MLS, Galvão AG, Zanin DS (2014). Yield of tomato fruits in relation to silicon sources and rates. *Horticultura Brasileira*, 32:220-224.
- Marschner H (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2<sup>a</sup> Ed. New York: Academic Press.

- McKinney HH (1923) Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26:195-217.
- Nielsen LW, Haynes F (1960) Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal* 37:260-267.
- Noda H, Machado FM (1993) Progresso na seleção de progênies de tomate resistentes à murcha bacteriana através da avaliação epidemiológica da doença. *Acta Amazonica* 23:107-114.
- Opina N, Tavner F, Holloway G, Wang JF, Li TH, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW, Timmis JN (1997) A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific Journal of Molecular Biology Biotechnology* 5:19-30.
- Oliveira, JC, Albuquerque GMR, Mariano RLR, Gondim DMF, Oliveira JTA, Souza EB (2012) Reduction of the severity of angular leaf spot of cotton mediated by silicon. *J. Plant Pathol* 94:297-304.
- Safni I, Cleenwerck I, Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: Proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R.*



*solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:3087-3103.

Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67:1051-1056.

Souza NM; Blind AD; Silva Filho DF; Rodrigues HS; Noda H (2013) Avaliação de linhagens e cultivares de tomate resistentes à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) desenvolvidas na Amazônia. Enciclopédia Biosfera 9:400-410.

Taiz L, Zeiger E (2004) Fisiologia vegetal. 3ª ed Porto Alegre RS. Artmed.

Umesha S (2006) Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. Phytoparasitica 34: 68-71.

Wang L, Cai KZ, Chen YT, Wang GP (2013) Silicon-mediated tomato resistance against *Ralstonia solanacearum* is associated with modification of soil microbial community structure and activity. Biological Trace Element Research 152:275–283.

Wydra k, Diogo R, Dannon E, Semrau J (2005) Soil amendment with silicon and bacterial antagonists induce resistance against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato. Disponível em: <http://www.tropentag.de/2005/abstracts/full/632.pdf>. Acessado em 19 março, 2016.

Zeraik AE, Souza FS, Filho-Fatibello O (2008) Desenvolvimento de um spot teste para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Química Nova* 31:731-734.

**Tabela 1** Conteúdo de nitrogênio ( $N^+$ ), fósforo ( $P^{+3}$ ), potássio ( $K^+$ ), magnésio ( $Mg^{+2}$ ), cálcio ( $Ca^{+2}$ ), cobre ( $Cu^{+2}$ ), boro ( $B^{+3}$ ), ferro ( $Fe^{+3}$ ), zinco ( $Zn^{+2}$ ), manganês ( $Mn^{+2}$ ), sódio ( $Na^+$ ) e pH em substrato tratado (+Si) ou não (-Si) com silício, avaliado 25 dias após a aplicação

Nutriente	Substrato	
	-Si <sup>a</sup>	+Si
$N^b$	5,38a <sup>c</sup>	5,31a
$P^{+3}$	1,65a	1,83a
$K^+$	15,35a	14,50b
$Mg^{+2}$	10,03a	10,50a
$Ca^{+2}$	10,80a	11,00a
$Cu^{+2}$	3,71a	1,98b
$B^{+3}$	5,21b	9,02a
$Fe^{+3}$	230,00a	280a
$Zn^{+2}$	36,00b	48,98a
$Mn^{+2}$	169,00b	207,00a
$Na^+$	260,98b	290,00a
pH	6,02b	6,66a

<sup>a</sup> Sem adição de silício e com adição de 3g de  $CaSiO_3$ /Kg de substrato comercial.

<sup>b</sup> Teor do macronutriente em g/Kg de substrato, exceto para o  $Cu^{+2}$  cujo teor está em mg/Kg de substrato.

<sup>c</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste T de Student

**Tabela 2** Componentes de resistência à murcha bacteriana de tomateiros ‘Santa Clara’, ‘TY 2006’ e ‘Yoshimatsu 4-11’, cultivados em substrato tratado (+Si) ou (-Si) e avaliado aos 15 dias após o transplântio em solo infestado com *R. solanacearum*

Componente de resistência	‘Santa Clara’		‘TY 2006’		‘Yoshimatsu 4-11’	
	-Si	+Si	-Si	+Si	-Si	+Si
Incidência (%)	80,90A <sup>a</sup>	80,98A	30,00A	40,00A	2,50A	0,00A
Severidade	2,62A	1,75B	1,50A	0,87B	0,90A	0,00A
AACPD <sup>b</sup>	66,25A	50,98A	14,60A	11,80B	0,30A	0,00A
IMB <sup>c</sup> (%)	69,00A	54,00B	59,00A	53,03B	0,05A	0,00A

<sup>a</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas, dentro de cada cultivar, não diferem entre si ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste T de Student.

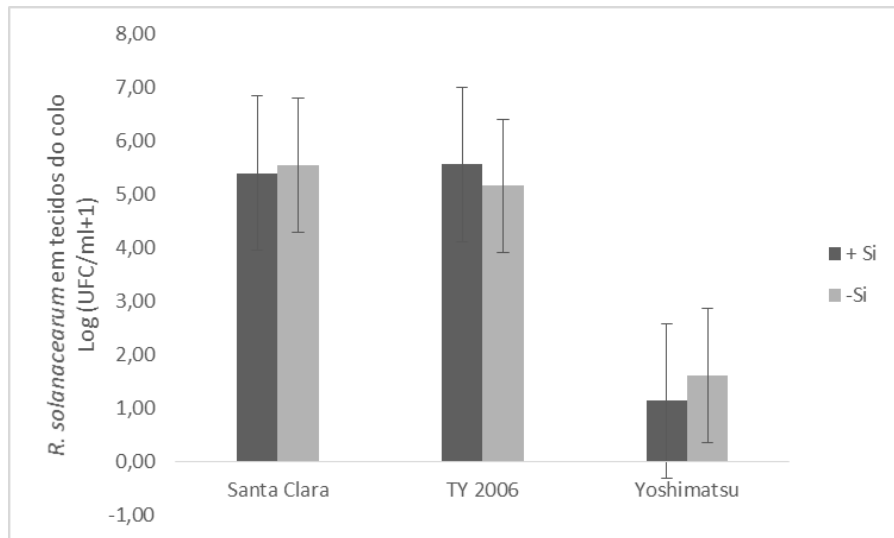
<sup>b</sup> AACPD – Área abaixo da curva de progresso da doença.

<sup>c</sup> IMB – Índice de murcha bacteriana.

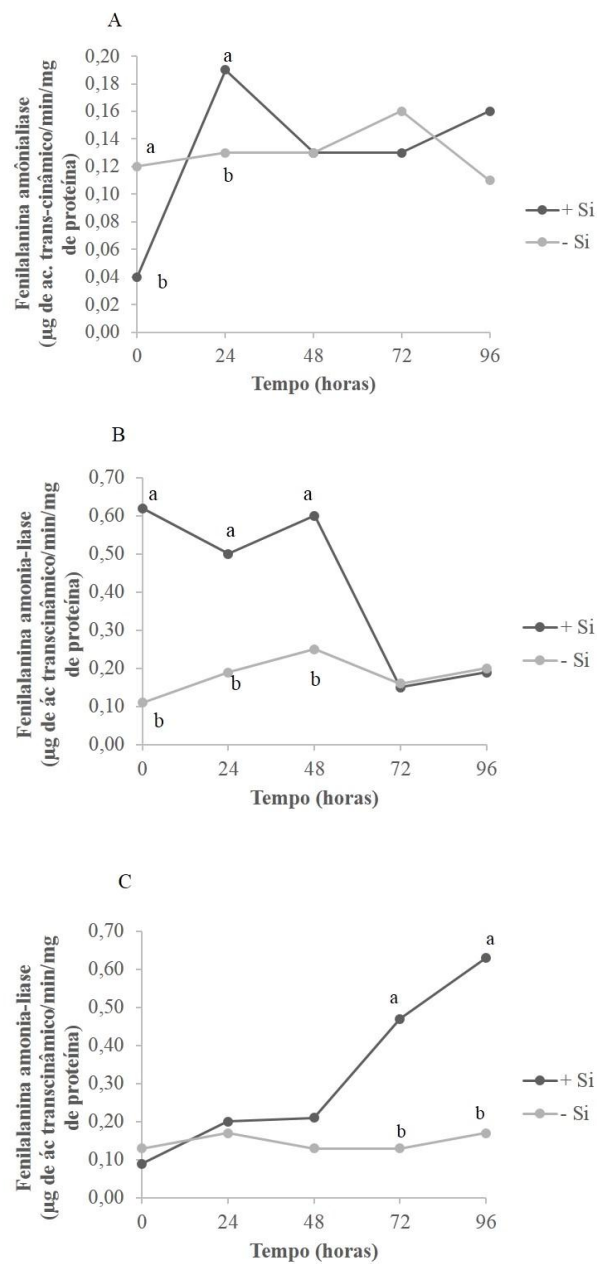
**Tabela 3** Crescimento de plantas de tomateiro ‘Santa Clara’ (suscetível), ‘TY 2006’ (moderadamente tolerante) e ‘Yoshimatsu 4-11’ (tolerante), avaliado aos 15 dias após o transplântio em solo infestado com *R. solanacearum*

Cultivar	Altura (cm)	Biomassa seca (g)	Clorofila (nm)
Yoshimatsu 4-11	18.62 a <sup>a</sup>	2.41a	32,27a
TY 2006	7.55b	0.56b	12,37b
Santa Clara	5.82b	0.49b	19,72b

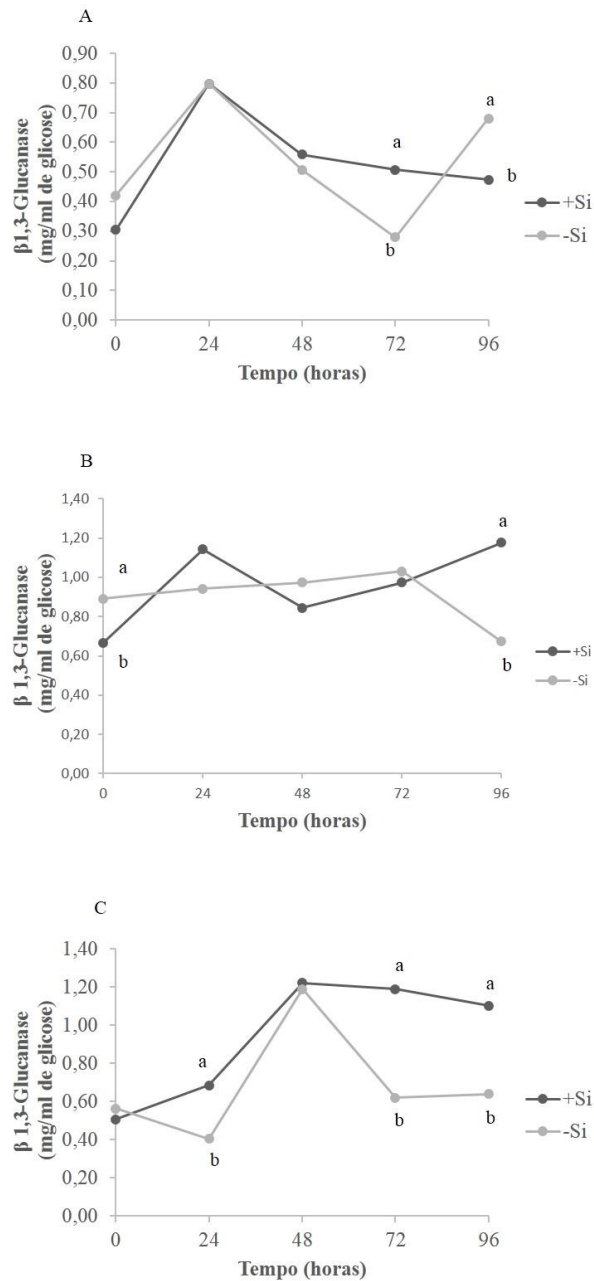
<sup>a</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste de LSD



**Fig. 1** População de *R. solanacearum* no caule (considerando-se da base do caule até 5 cm acima) de tomateiros ‘Santa Clara’, ‘TY 2006’ e ‘Yoshimatsu 4-11’, cultivadas em substrato tratado com silício (+Si) ou (-Si) e avaliadas aos 15 dias após o transplântio para solo infestado (+Rs) com a bactéria.



**Fig. 2** Atividade da fenilalanina-amonialase (FAL) em plantas de tomateiro cvs. Santa Clara (A), TY 2006 (B) e Yoshimatsu 4-11 (C), cultivadas em substrato (+Si e -Si), avaliada nos tempos 0 h – uma hora antes da inoculação, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após a inoculação, que constou do transplantio para solo infestado com *R. solanacearum*. Médias seguidas pela mesma letra em cada tempo não diferem entre si ( $P \leq 0,05$ ) pelo Teste T de Student



**Fig. 3** Atividade da  $\beta$  1,3-glicanase (GLU) em plantas de tomateiro cvs. Santa Clara (A), TY 2006 (B) e Yoshimatsu 4-11 (C), cultivadas em substrato tratado com silício (+Si) e (-Si), avaliada nos tempos 0 h – uma hora antes da inoculação, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após a inoculação, que constou do transplante para solo infestado com *R. solanacearum*. Médias seguidas pela mesma letra em cada tempo não diferem entre si ( $P \leq 0,05$ ) pelo Teste T de Student



## CONCLUSÕES GERAIS

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- O óleo essencial de cravo a 0,14 % destacou-se como bactericida com ação direta contra *R. solanacearum in vitro* e biofumigante no solo, reduzindo a murcha bacteriana do tomateiro e melhorando o desenvolvimento das plantas.
- O eugenol, principal constituinte químico do óleo de cravo, é o responsável por grande parte da ação deste óleo.
- A suplementação de substrato comercial com 3g/Kg de silicato de cálcio reduziu a severidade da murcha bacteriana em tomateiros das cultivares Santa Clara e TY2006.
- O silício promoveu maior atividade das enzimas  $\beta$ -1,3 glucanase e fenilalanina-amonialiase, indicando atuação na indução de resistência a esta doença.
- O manejo da murcha bacteriana do tomateiro poderá ser incrementado com a produção de mudas em substrato com Si e a biofumigação do solo com óleo de cravo.