

NADSON DE CARVALHO PONTES

**ÓLEO ESSENCIAL DE MOSTARDA E CONTROLE EXPERIMENTAL DA
MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO (*Ralstonia solanacearum*):
EFETIVIDADE E TOXIDEZ AO PATÓGENO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2009

NADSON DE CARVALHO PONTES

**ÓLEO ESSENCIAL DE MOSTARDA E CONTROLE EXPERIMENTAL DA
MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO (*Ralstonia solanacearum*):
EFETIVIDADE E TOXIDEZ AO PATÓGENO**

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

APROVADA: 13 de fevereiro de 2009.

Prof. Onkar Dev Dhingra
(Co-orientador)

Prof^a. Rosângela D’Arc de Lima Oliveira
(Co-orientadora)

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro

Prof. Derly José Henriques da Silva

Prof. José Rogério de Oliveira
(Orientador)

**À Deus,
Pelo dom da vida.
À minha Família,
Alicerce de toda minha
formação.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, por possibilitar a realização deste curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa concedida durante o curso.

Ao Professor José Rogério de Oliveira, pela amizade, orientação e confiança dedicadas a mim durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Onkar Dev Dhingra, pela orientação e colaboração durante o desenvolvimento dos experimentos.

À Professora Rosângela D’Arc de Lima Oliveira, pela solicitude e dicas durante a execução deste trabalho.

Aos Professores Reginaldo da Silva Romeiro e Derly José Henriques da Silva, pelas sugestões apresentadas, pela atenção e pela disponibilidade em participar da banca de defesa da dissertação.

À Miriam Fumiko Fujinawa, pelo auxílio e companheirismo durante toda a realização desta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia e Patologia de Sementes, em especial à Hyana, por toda a ajuda dedicada a mim durante o curso de mestrado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos passados ao longo deste curso.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pelo auxílio em diversos momentos da execução deste trabalho.

Aos colegas de fitopatologia e demais amigos de Viçosa, em especial aos amigos Daniel e Luciano, pelo auxílio e amizade.

Aos meus pais, Pontes e Nazidir, pelo carinho, educação, apoio e confiança tidos a mim durante toda a minha existência.

Ao meu irmão Raifran, pelo incentivo e amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista.

BIOGRAFIA

NADSON DE CARVALHO PONTES, filho de Raimundo Ferreira Pontes e Maria Nazidir de Carvalho Pontes, nasceu no dia 7 de julho de 1984, na cidade de São Luís, capital do Estado do Maranhão.

Em março de 2002, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), onde obteve o grau de Engenheiro Agrônomo em agosto de 2006.

Iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa em março de 2007, submetendo-se a defesa da dissertação no dia 13 de fevereiro de 2009.

ÍNDICE

RESUMO.....	iiv
ABSTRACT.....	iiiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
A cultura do Tomate.....	3
A murcha bacteriana do tomateiro.....	3
Métodos de detecção da bactéria no solo.....	6
O potencial dos isotiocianatos no controle da murcha bacteriana.....	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
CAPÍTULO 1.....	14
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1. Obtenção, padronização e preservação dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
2.2. Calibração da concentração de inóculo.....	18
2.3. Sensibilidade dos meios seletivos.....	18
2.4. Determinação do índice de repressão (IR) dos meios seletivos.....	19
2.5. Determinação do índice de supressão (IS) dos meios seletivos.....	19
2.6. Determinação da taxa de recuperação de <i>Ralstonia solanacearum</i> do solo..	20
2.7. Local de realização da pesquisa e análises estatísticas.....	21
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Sensibilidade dos meios seletivos.....	21
3.2. Determinação do índice de repressão (IR) dos meios seletivos.....	22
3.3. Determinação do índice de supressão (IS) dos meios seletivos.....	23
3.4. Determinação da taxa de recuperação de <i>Ralstonia solanacearum</i> do solo..	24
4. DISCUSSÃO.....	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
APÊNDICE.....	32
CAPÍTULO 2.....	34
RESUMO.....	34

ABSTRACT.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1. Procedimentos Gerais.....	38
2.1.1. Obtenção, padronização e preservação dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i>	38
2.1.2. Calibração da concentração de inóculo.....	38
2.1.3. Óleo Essencial de Mostarda.....	39
2.1.4. Substrato utilizado.....	39
2.1.5. Plantas de tomate.....	39
2.2. Mortalidade <i>in vitro</i> de <i>Ralstonia solanacearum</i> pelos vapores do óleo essencial de mostarda.....	39
2.3. Efeito dos vapores do óleo essencial de mostarda sobre as colônias de <i>Ralstonia solanacearum</i>	40
2.4. Sensibilidade de diferentes espécies bacterianas aos vapores do óleo essencial de mostarda.....	41
2.5. Efeito do óleo essencial de mostarda sobre a população de <i>Ralstonia solanacearum</i> no solo.....	42
2.6. Efeito do óleo essencial de mostarda no controle da murcha bacteriana do tomateiro.....	42
2.7. Local de realização da pesquisa e análises estatísticas.....	43
3. RESULTADOS.....	43
3.1. Mortalidade <i>in vitro</i> de <i>Ralstonia solanacearum</i> pelos vapores do óleo essencial de mostarda.....	43
3.2. Efeito dos vapores do óleo essencial de mostarda sobre as colônias de <i>Ralstonia solanacearum</i>	44
3.3. Sensibilidade de diferentes espécies bacterianas aos vapores do óleo essencial de mostarda.....	46
3.4. Efeito do óleo essencial de mostarda sobre a população de <i>Ralstonia solanacearum</i> no solo.....	47
3.5. Efeito do óleo essencial de mostarda no controle da murcha bacteriana do tomateiro.....	48
4. DISCUSSÃO.....	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
CONCLUSÕES GERAIS.....	60

RESUMO

PONTES, Nadson de Carvalho Pontes. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Óleo essencial de mostarda e controle experimental da murcha bacteriana do tomateiro (*Ralstonia solanacearum*): efetividade e toxidez ao patógeno**. Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-orientadores: Onkar Dev Dhingra e Rosângela D’Arc de Lima Oliveira.

A ocorrência de murcha bacteriana é um dos principais fatores limitantes ao cultivo de tomate em regiões tropicais, principalmente devido à falta de métodos efetivos de controle. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do óleo essencial de mostarda no tratamento do solo para a supressão da população de *Ralstonia solanacearum*. Inicialmente, avaliaram-se diferentes meios seletivos para a detecção e monitoramento da população da bactéria no solo. Dos meios avaliados, apenas dois apresentaram sensibilidade adequada para a detecção da bactéria, sendo que, o meio South Africa Selective Medium – Elphinstone (SMSA-E) possibilitou a maior taxa de recuperação da bactéria no solo, com baixo índice de repressão ao patógeno alvo e alto índice de supressão à microrganismos contaminantes. Quanto ao efeito dos vapores do EOM sobre *R. solanacearum*, estes foram capazes de inibir completamente o seu desenvolvimento *in vitro*. A exposição das colônias bacterianas aos vapores do EOM ocasionou aumento do extravasamento de metabólitos celulares. Bactérias anaeróbicas facultativas e/ou gram-positivas foram menos sensíveis ao produto que *R. solanacearum*. Após fumigação por sete dias do substrato com EOM em concentrações a partir de 100µL de ITCA/L de solo, não se observou a recuperação da bactéria com o meio seletivo SMSA-E. As plantas de tomate cultivadas no substrato submetido a este mesmo tratamento não apresentaram sintomas de murcha bacteriana após 45 dias do transplante.

ABSTRACT

PONTES, Nadson de Carvalho Pontes. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Essential oil of mustard and bacterial wilt on experimental control in tomato (*Ralstonia solanacearum*): effectiveness and toxicity to the pathogen.** Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-advisers: Onkar Dev Dhingra and Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.

The occurrence of bacterial wilt is one of the main restrictions to the tomato production in tropical areas, mainly due to the lack of effective methods of control. The research had the objective to evaluate the efficiency of the essential oil of mustard in the treatment of the soil for the suppression of the population of *Ralstonia solanacearum*. Initially, different selective mediums were evaluated for the detection and quantification of the bacterial population in the soil. Among the appraised mediums, only two mediums showed appropriate sensibility for the detection of the bacteria, and the South Africa Selective Medium - Elphinstone (SMSA-E) showed the highest recovery tax of the bacteria in the soil, the lowest repression index to the *R. solanacearum* and highest suppression index of background microorganisms. In the evaluation of the EOM gaseous effect against *R. solanacearum*, this was capable to inhibit it *in vitro* development completely. The bacterial colonies that were exoposited to the EOM gaseous increased the linkage of cellular metabolites. Anaerobic and gram-positive bacterias were less sensitivity to the product than *R. solanacearum*. The recovery of the bacteria was not observed with the selective medium SMSA-E, after substratum fumigation for seven days with EOM in concentrations over 100 μ L of ITCA/L of soil. The tomato plants cultivated in the substratum submitted to this same treatment had not present symptoms of bacterial wilt after 45 days of the transplant.

INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é bastante difundido em todo o mundo. Entretanto, um dos grandes problemas desta cultura é a alta susceptibilidade ao ataque de pragas e doenças, sendo estas últimas as principais causas de perdas na produção. Dentre estas doenças podemos destacar a murcha bacteriana, a qual está amplamente distribuída no mundo e torna-se muitas vezes limitante para a cultura do tomate em regiões de clima tropical. O agente etiológico desta doença é a bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* 1996, a qual é nativa de muitos solos em regiões distintas do globo (Hayward, 1991).

A detecção da bactéria em campos infestados é bastante difícil, visto a ocorrência de baixas populações no solo e a distribuição desuniforme (Priou *et al.*, 2006). Em estudos sobre a sobrevivência de *R. solanacearum* no solo, são apresentados diversos métodos de detecção e quantificação da população bacteriana. A utilização de plantas indicadoras, métodos moleculares, sorológicos e meios seletivos tem sido relatada em vários trabalhos (Pradhanang *et al.*, 2000). Porém, são estes últimos os mais conhecidos e utilizados, em decorrência do baixo custo e praticidade. A eficiência dos meios seletivos pode variar em relação aos isolados de *R. solanacearum* utilizados (Priou *et al.*, 2006). Assim, a escolha de um meio seletivo para estudos da dinâmica populacional da bactéria no solo deve levar em consideração a sua eficiência em relação ao grupo de isolados que se vai trabalhar.

O controle da murcha bacteriana é bastante difícil, visto que as práticas culturais tradicionais como rotação de culturas, o uso de variedades resistentes e o pousio não são eficientes, devido às características de ampla gama de hospedeiros, alta variabilidade genética e capacidade de sobreviver no solo por muitos anos, apresentadas pela bactéria (Hayward, 1991).

O tratamento do solo com produtos químicos, como o brometo de metila, é relatado como a única forma de eliminação da bactéria. Entretanto, a alta toxicidade deste produto, aliada ao dano que o mesmo causa ao ambiente, tem levado à gradativa proibição de sua utilização (Duniway, 2002). Desde então, técnicas alternativas de tratamento do solo são testadas para suprimir a população do patógeno no solo.

Há resultados satisfatórios no controle da murcha bacteriana pela incorporação de tecidos de brássicas ao solo (Arthy *et al.*, 2005; Olivier *et al.*, 2006).

Estes resultados são atribuídos aos produtos da degradação dos componentes destes tecidos. Entre estes, podemos destacar o isotiocianato de alila (ITCA), tanto pela concentração com que é produzido, quanto pelo seu efeito na inibição do desenvolvimento de microrganismos (Dhingra *et al.*, 2004a). Esta substância pode ser extraída de sementes de mostarda (*Brassica* spp.) ou produzido sinteticamente, sendo também denominado óleo essencial de mostarda (EOM).

Trabalhos utilizando o ITCA como fumigante do solo revelam seu potencial de controle, principalmente de fungos e nematóides (Chitwood, 2002; Dhingra *et al.*, 2004a; Harvey *et al.*, 2002; Zasada & Ferris, 2003). Existem também trabalhos confirmando a ação bactericida do ITCA sobre bactérias patogênicas a humanos e contaminantes de alimentos (Lin *et al.*, 2000a; Lin *et al.*, 2000b; Shin *et al.*, 2004). Quanto a bactérias fitopatogênicas, o seu efeito foi demonstrado apenas para *Pseudomonas corrugata*, agente causal da necrose da medula do tomateiro (Delaquis & Sholberg, 1997).

O presente trabalho teve como objetivos, avaliar a eficiência de diversos meios seletivos na detecção e na quantificação de isolados de *R. solanacearum* originários do Brasil, bem como de avaliar o efeito dos vapores do EOM sobre a bactéria *in vitro* e no solo, e a possibilidade de sua utilização para o controle da murcha bacteriana do tomateiro.

REVISÃO DE LITERATURA

A cultura do Tomate

O tomateiro é uma planta originária da região dos Andes, mais precisamente na faixa que vai do norte do Chile até o sul do Equador. Linnaeus, em 1753, o classificou como pertencente ao gênero *Solanum*, sendo então denominado de *Solanum lycopersicum* (Mattedi *et al.*, 2007). Miller, em 1768, reclassificou o tomate para o gênero *Lycopersicon*, sendo a espécie então denominada *Lycopersicon esculentum* (Taylor, 1986). Recentemente, estudos baseados em dados moleculares do DNA do cloroplasto apontaram ser o tomate pertencente ao gênero *Solanum*, sendo as cultivares existentes enquadradas nas espécies *Solanum lycopersicum* L., *S. chmielewskii* e *S. lycopersicum* var. *cerasiformei* (Spooner *et al.*, 1993).

O tomate é a cultura olerícola mais disseminada em todo o mundo (Filgueira, 2003). A produção mundial de tomate duplicou nos últimos 20 anos, resultado do aumento da demanda, impulsionada pela grande variedade de produtos industriais derivados deste e das vantagens nutricionais. Estão no topo da lista de países produtores China, EUA e Turquia, com o Brasil ocupando a 9º posição no ranking (Carvalho & Pagliuca, 2007). Esta cultura é a segunda hortaliça em importância econômica no Brasil, sendo superada apenas pela batata. A produção nacional (somando-se os volumes destinados à mesa e à indústria) em 2007 foi de 3.364.438 toneladas (Fao, 2008). Os principais Estados produtores são Goiás, São Paulo e Minas Gerais, os quais foram responsáveis por 23,9, 21,3, e 12,5% da produção nacional de tomate, respectivamente (IBGE, 2007).

A murcha bacteriana do tomateiro

A murcha bacteriana ou murchadeira é uma das principais doenças da cultura do tomate e de muitas outras solanáceas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Hayward, 1991). Países do sudeste asiático, como Taiwan e Índia, têm apresentado de 15 a 100% de incidência da doença durante a estação do verão (Wang & Lin, 2005). No Brasil, ela chega a ser limitante na produção de

tomate nas regiões Norte e Nordeste, além de acarretar perdas significativas no Centro-sul do país durante as épocas mais quentes do ano (Silveira *et al.*, 1996).

O agente etiológico consiste em uma bactéria gram negativa, aeróbica, em forma de bastonete, com um ou mais flagelos em uma das extremidades (Schaad *et al.*, 2001). A bactéria foi identificada pela primeira vez por Smith, que a denominou *Bacillus solanacearum* e em 1914, a reclassificou como *Pseudomonas solanacearum* (Buddenhagen & Kelman, 1964). Durante os anos 90, esta bactéria foi reclassificada como *Burkholderia solanacearum* e, posteriormente, em *Ralstonia solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1992; Yabuuchi *et al.*, 1995).

Ralstonia solanacearum possui uma ampla gama de hospedeiros, na qual estão centenas de espécies de plantas pertencentes a 44 famílias botânicas (Hayward, 1991). A grande heterogeneidade de *R. solanacearum* no que diz respeito a gama de hospedeiros, distribuição geográfica, patogenicidade, relações epidemiológicas e propriedades fisiológicas, fez necessário a adoção de formas de classificação subespecíficas. Dentre os sistemas de classificação propostos, merecem importância os de biovars e raças, pois são os mais utilizados na caracterização da bactéria. A classificação em biovars leva em consideração a capacidade dos isolados de *R. solanacearum* em oxidar vários açúcares e álcoois (He *et al.*, 1983). A classificação em raças leva em consideração a ampla gama de hospedeiros apresentada pela bactéria (Buddenhagen *et al.*, 1962). Este critério demonstra maior importância prática que a classificação em biovar, visto que o conhecimento da raça ajuda a avaliar o potencial de patogenicidade de *R. solanacearum* em uma dada área. Os critérios de classificação em biovar e raças são grupos informais a nível infrasubspecíficos, que não são governados pelo Código de Nomenclatura de Bactérias (Hayward, 1991).

Recentemente, Fegan e Prior (2005), citados por Guidot *et al.* (2007), revelaram por meio de estudos moleculares que *R. solanacearum* é um complexo de espécies e não uma espécie única, e propuseram uma nova classificação genética baseada em quatro níveis taxonômicos, equivalentes a espécies, subespécies, grupos infra-específicos e linhagens clonais. Entretanto, os sistemas de raças e biovars continuam a ser utilizados pela comunidade científica pela sua simplicidade e praticidade.

A murcha em plantas de tomate pode ser ocasionada pelas raças 1 e 3, sendo que a primeira é típica de regiões mais quentes, com temperaturas próximas a 35-37

°C. Já a raça 3 se desenvolve melhor em regiões de clima mais ameno, tendo seu ponto ótimo em 27 °C (Hayward, 1991).

Ralstonia solanacearum é capaz de sobreviver no solo por vários anos, associada aos restos de cultura e à rizosfera de plantas (Lopes & Quezado-Soares, 2000). Por apresentar uma fase epifítica em seu ciclo de vida, a bactéria aumenta suas possibilidades de sobrevivência no solo, mesmo na ausência de hospedeiros (Hayward, 1991). O sítio de infecção geralmente se dá na raiz, onde ela se desloca sistemicamente através do xilema (Buddenhagen & Kelman, 1964).

Após a infestação do solo por *R. solanacearum*, o controle da murcha bacteriana torna-se difícil e, muitas vezes, impraticável, seja pela ineficiência, inviabilidade técnica ou inviabilidade econômica (Hayward, 1991). Isto se deve principalmente à ampla gama de hospedeiros, alta variabilidade genética, capacidade de sobrevivência do patógeno por longos períodos e pela localização protegida do patógeno na planta.

A obtenção de variedades resistentes é bastante difícil, devido à dificuldade de se achar boas fontes de resistência às diferentes variantes da bactéria. Além do mais, a resistência do tomate à murcha bacteriana é do tipo poligênica e que muitas vezes sofre interferência do ambiente ou traz consigo características agronômicas indesejáveis (Lopes & Quezado-Soares, 2000).

O controle biológico é uma alternativa que vem mostrando potencial razoável no controle de vários patógenos de solo, assim como *R. solanacearum* (Hayward, 1991; Lemessa & Zeller, 2007). Entretanto, estudos mais aprofundados quanto à sobrevivência, modo de ação, formulações e modo de aplicação dos agentes de controle biológico, são necessários para que estes possam ser avaliados em escala comercial (Lopes & Quezado-Soares, 2000). Métodos de controle físico, principalmente a solarização, apresentam resultados satisfatórios, principalmente quando associada à biofumigação (Di Bisceglie *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2005).

O controle químico não é muito recomendado devido ao alto custo, impacto ambiental e baixa eficiência quando utilizado em nível de campo. Entretanto, o brometo de metila foi utilizado com grande eficácia durante muitos anos para a esterilização de substrato e, em certos casos, para a desinfestação de campos de produção para cultivo protegido (Duniway, 2002). Em decorrência aos danos que este ocasiona ao meio ambiente, principalmente em relação ao efeito deletério sobre a camada de ozônio, o uso do brometo de metila tem sido gradativamente restringido

em todo o mundo, seguindo as recomendações do Protocolo de Montreal (Messiha *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2006).

Métodos de detecção da bactéria no solo

Por ser uma bactéria habitante do solo, trabalhos na área de controle ou epidemiologia, que visem estudar a flutuação populacional de *R. solanacearum* no solo dependem de técnicas que sejam capazes de detectar e quantificar a bactéria neste ambiente. Segundo Granada & Sequeira (1983), a bactéria pode ser detectada no solo de forma indireta e direta. O método indireto consiste em plantar ou expor tecido do hospedeiro suscetível e observar a ocorrência da doença. Métodos diretos consistem no uso de meios seletivos, análise sorológica, microscopia e técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR).

Os métodos indiretos foram os primeiros a serem utilizados para a detecção de *R. solanacearum* no solo (Jenkins *et al.*, 1967). Tavares *et al.* (2000) utilizaram bioensaios com plantas de tomate para estabelecer um sistema de análise de risco para ocorrência da murcha bacteriana em áreas de plantio. Existe certa resistência em se utilizar métodos indiretos para a detecção de bactérias fitopatogênicas no solo, pois estes requerem considerável período de tempo e seus resultados são bastante imprecisos (Jenkins *et al.*, 1967).

O advento da biologia molecular em geral e da reação em cadeia da polimerase (PCR) em particular, tem aberto possibilidades de detecção e identificação de espécies de bactérias nos mais variados substratos, inclusive no solo. Pradhanang *et al.* (2000), em trabalho comparando as técnicas de meio seletivo, PCR e ELISA, verificaram que o método de PCR apresentou grande potencial, sendo uma técnica sensível e específica de detecção para estudos da sobrevivência de *R. solanacearum* no solo. Entretanto, o seu custo significativo, aliada a falta de estrutura apropriada para sua realização em muitos laboratórios, limita a sua utilização, sendo executada apenas para calibrar técnicas de custo mais baixo (Van Der Wolf *et al.*, 2000).

O método de sorologia também tem sido utilizado na detecção da bactéria no solo, por se tratar de uma técnica relativamente simples e capaz de avaliar um grande número de amostras com custo relativamente baixo. Jenkins *et al.* (1967) compararam os resultados obtidos por uma técnica sorológica, bioensaios e sementeio

de diluições do extrato do solo em meio de cultura, para a detecção de *R. solanacearum* no solo. Eles observaram que os testes sorológicos, utilizando o anti-soro produzido pela injeção de suspensão bacteriana em coelhos, foram mais eficientes em todos os parâmetros avaliados, apresentando resultados em 3 dias. Van Der Wolf *et al.* (2000) desenvolveram uma metodologia de rápida detecção de *R. solanacearum*, onde colônias da bactéria foram localizadas em amostras de solo pelo método da imunofluorescência. Entretanto, alguns estudos utilizando métodos sorológicos, como o ELISA, só apresentaram eficácia quando a população da bactéria excedia 10^4 ufc (unidade formadora de colônia)/g de solo, sendo a técnica potencialmente propensa a dar reações falso-positivas (Pradhanang *et al.*, 2000). Sendo assim, não apresenta a sensibilidade requerida para estudos epidemiológicos e dificilmente pode ser utilizado para quantificação (Elphinstone *et al.*, 1996; Pradhanang *et al.*, 2000).

Na maior parte dos estudos onde se busca a detecção e a quantificação de *R. solanacearum*, tem-se utilizado meios seletivos. Esta maior aceitabilidade pode ser um reflexo da sua praticidade, sensibilidade e especificidade, associados a um baixo custo e precisa quantificação de populações viáveis no solo (Pradhanang *et al.*, 2000). No decorrer dos anos, vários meios seletivos para *R. solanacearum* vêm sendo desenvolvidos nas diversas regiões do mundo (Elphinstone *et al.*, 1996; Granada & Sequeira, 1983; Hara *et al.*, 1995; Karganilla & Buddenhagen, 1972; Nesmith & Jenkins Jr., 1979). No Brasil, podemos citar o meio desenvolvido por Moura & Romeiro (1998), o qual teve sua eficiência avaliada para diversos isolados provenientes de várias regiões do mundo. Apesar de possibilitar o desenvolvimento da grande maioria dos isolados avaliados, este meio apresentou uma alta taxa de repressão, acima de 75%, o que pode impedir a detecção e a quantificação de *R. solanacearum* em baixos níveis populacionais. Um grande empecilho para a utilização de meios seletivos é o fato de estes apresentarem eficácia variável, pois muitas vezes só funcionam perfeitamente para os isolados utilizados na sua confecção (Priou *et al.*, 2006).

O potencial dos isotiocianatos no controle da murcha bacteriana

A incorporação de tecidos de brássicas ao solo tem proporcionado resultados satisfatórios no controle da murcha bacteriana (Arthy *et al.*, 2005; Olivier *et al.*,

2006). Estes têm sido atribuídos à degradação de seus componentes, como os glucosinolatos. Eles são encontrados em todas as crucíferas, incluindo várias culturas da família das brássicas, como por exemplo, couve de Bruxelas, brócolis, couve-flor, repolho, agrião, mostarda, entre outras (Song *et al.*, 2005). Entretanto, os glucosinolatos possuem limitada atividade biológica até o momento em que eles são hidrolisados pela enzima mirosinase, sendo os produtos originados desta reação tóxicos, antinutricionais e aleloquímicos a certos microorganismos (Borek *et al.*, 1995).

Os glucosinolatos e a enzima mirosinase encontram-se em compartimentos separados dentro dos tecidos intactos das plantas. Assim, esta reação só ocorre quando a compartimentalização é perdida devido aos danos físicos e na presença de água (Song *et al.*, 2005). Os isotiocianatos são um dos grupos de substâncias produzidas em maior quantidade pela degradação enzimática dos glucosinolatos e estão relacionados aos efeitos nematicida, fungicida, inseticida e bactericida observados após esta degradação. Já foram identificados mais de 50 tipos de isotiocianatos resultantes da degradação de tecidos de Brássicas (Borek *et al.*, 1995).

Alguns autores atribuem aos isotiocianatos, um papel importante na resistência de plantas à patógenos bacterianos. Tierens *et al.* (2001) observaram que *Arabidopsis*, transformadas com a deleção do gene responsável pela produção de 4-metilsulfinilbutil isotiocianato, se mostraram mais suscetíveis aos patógenos fúngicos e bacterianos, dentre eles *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas syringae*. No caso de *R. solanacearum*, testes *in vitro* demonstraram o efeito inibidor de 2-feniletil-isotiocianato e benzil-isotiocianato (Olivier *et al.*, 2006; Smith & Kirkegaard, 2002).

Entre os mais abundantes isotiocianatos produzidos pela degradação dos tecidos de brássicas podemos destacar o isotiocianato de alila (Borek *et al.*, 1995). Ele pode ser extraído em altas concentrações nas sementes de mostarda (*Brassica* spp.), sendo também denominado óleo essencial de mostarda, ou obtido sinteticamente, sendo muito utilizado na indústria de alimentos (Dhingra *et al.*, 2004a; Dhingra *et al.*, 2004b). O efeito deletério do ITCA sobre fitopatógenos habitantes do solo já foi relatado para nematóides, como *Globodera rostochiensis*, *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchu neglectus*, *Tylenchulus semipenetrans* e *Xiphinema americanum* (Chitwood, 2002; Zasada & Ferris, 2003), e fungos, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici*, *Phytophthora nicotianae*,

Rhizoctonia solani, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* (Dhingra *et al.*, 2004a; Harvey *et al.*, 2002).

O ITCA demonstrou efeito bactericida sobre *Pseudomonas corrugata*, agente etiológico da necrose-da-medula do tomateiro (Delaquis & Sholberg, 1997). Entretanto, a maioria dos relatos sobre esta propriedade é encontrada em trabalhos de outras áreas, como tecnologia de alimentos e medicina humana. Lin *et al.* (2000b) citam o ITCA como substância promissora na preservação de alimentos contra bactérias, como *Salmonella montevideo*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Shin *et al.* (2004) avaliou o efeito do ITCA extraído de wasabi (*Wasabia japonica*) na substituição de antibióticos tradicionais sobre a bactéria *Helicobacter pylori*, causadora de gastrite crônica e úlcera em humanos. Os autores comprovaram a atividade bactericida do ITCA, além de serem citados outros trabalhos que relatam este efeito sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias patogênicas a humanos.

Lin *et al.* (2000b) realizaram um experimento para verificar o modo de ação dos vapores de ITCA sobre a célula bacteriana, tendo como base bactérias gram-negativas (*S. montevideo* e *E. coli*) e gram-positiva (*L. monocytogenes*). Os vapores de ITCA causaram perda de metabólitos, mensurável aumento na atividade da β -galactosidase e redução de células viáveis. Também observou-se que as bactérias gram-negativas foram mais sensíveis ao ITCA que as gram-positivas. Sendo assim, os autores atribuíram o efeito antibacteriano à perda da permeabilidade das membranas e extravasamento dos metabólitos intracelulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTHY, J.R., AKIEW, E.B., KIRKEGAARD, J.A. & TREVORROW, P.R. Using Brassica spp. as biofumigants to reduce the population of *Ralstonia solanacearum*. In: ALLEN, C., PRIOR, P. & HAYWARD, A.C. (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Mareeba: American Phytopathological Society 2005.

BOREK, V., MORRA, M.J., BROWN, P.D. & MCCAFFREY, J.P. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in Soil. Journal of Agriculture and Food Chemistry 43:1935-1940. 1995.

BUDDENHAGEN, I. & KELMAN, A. Biological and Physiological Aspects of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 2:203-230. 1964.

- BUDDENHAGEN, I., SEUQUEIRA, L. & KELMAN, A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726. 1962.
- CARVALHO, J.L. & PAGLIUCA, L.G. Tomate: um mercado que não pára de crescer globalmente. *Hortifruti Brasil* Jun:6-5. 2007.
- CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control 1. *Annual Review of Phytopathology* 40:221. 2002.
- DELAQUIS, P.J. & SHOLBERG, P.L. Antimicrobial Activity of Gaseous Allyl Isothiocyanate. *Journal of food protection* 60:943-947. 1997.
- DHINGRA, O.D., COSTA, M.L.N. & SILVA, G.J. Potential of allyl isothiocyanate to control *Rhizoctonia solani* seedling damping off and seedling blight in transplant production. *Journal of Phytopathology* 152:352-357. 2004a.
- DHINGRA, O.D., COSTA, M.L.N., SILVA, J.G.J. & MIZUBUTI, E.S.G. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. *Fitopatologia Brasileira* 29:683-686. 2004b.
- DI BISCEGLIE, D.P., SACCARDI, A., GIOSUE, S., TRAVERSA, F. & MAZZUCCHI, U. Survival of *Ralstonia solanacearum* on wood, high density polyethylene and on jute fabric in cold storage. *Journal of Plant Pathology* 87:145-147. 2005.
- DUNIWAY, J.M. Status of Chemical Alternatives to Methyl Bromide for Pre-Plant Fumigation of Soil. *Phytopathology* 92:1337-1343. 2002.
- ELPHINSTONE, J.G., HENNESSY, J., WILSON, J.K. & STEAD, D.E. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPP0 Bulletin* 26:663-678. 1996.
- FAHEY, J.W., ZALCMANN, A.T. & TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51. 2001.
- FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa-MG: UFV. 412p. 2003.
- GRANADA, G.A. & SEQUEIRA, L. A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease* 67:1084-1088. 1983.
- GUIDOT, A., PRIOR, P., SCHOENFELD, J., CARRERE, S., GENIN, S. & BOUCHER, C. Genomic Structure and Phylogeny of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Inferred from Gene Distribution Analysis. *The Journal of Bacteriology* 189:377-387. 2007.
- HARA, H., KOGA, K. & TANAKA, H. Medium for quantitative isolation of *Pseudomonas solanacearum*. *Annual of Phytopathological Society of Japan* 61:255. 1995.
- HARVEY, S.G., HANNAHAN, H.N. & SAMS, C.E. Indian mustard and allyl isothiocyanate inhibit *Sclerotium rolfsii*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:27-31. 2002.
- HAYWARD, A.C. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:65-87. 1991.

- HE, L.Y., SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Diseases* 67:1357-1361. 1983.
- JENKINS, S.F., MORTON JR, D.J. & DUKES, P.D. Comparassion of techniques for detection of *Pseudomonas solanaceraum* in artificially infested soil. *Phytopathology* 57:25-27. 1967.
- JI, P., MOMOL, M.T., OLSON, S.M., PRADHANANG, P.M. & JONES, J.B. Evaluation of Thymol as Biofumigant for Control of Bacterial Wilt of Tomato Under Field Conditions. *Plant Disease* 89:497. 2005.
- KARGANILLA, A.D. & BUDDENHAGEN, I.W. Development of a selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 62:1373-1376. 1972.
- LEMESSA, F. & ZELLER, W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control* 42:336-344. 2007.
- LIN, C.M., KIM, J., DU, W.X. & WEI, C.I. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. *Journal of food protection* 63:25-30. 2000a.
- LIN, C.M., PRESTON, J.F. & WEI, C.I. Antibacterial Mechanism of Allyl Isothiocyanate. *Food Protection* 63:727-734. 2000b.
- LOPES, C.A. & QUEZADO-SOARES, A.M. Doenças causadas por bactérias em tomate. pp.879 In: ZAMBOLIM, L., DO VALE, F.X.R. & COSTA, H. (Eds.) Controle de doenças de plantas: hortaliças. Viçosa: Suprema. 2000.
- MATTEDI, A.P., SOARES, B.O., ALMEIDA, V.S., GRIGOLLI, J.F.J., DA SILVA, L.J. & DA SILVA, D.J.H. Introdução à cultura do tomate. In: DA SILVA, D.J.H. & DO VALE, F.X.R. (Eds.) Tomate - tecnologia de produção. Viçosa: Suprema. 2007.
- MESSIHA, N., VAN DIEPENINGEN, A., WENNEKER, M., VAN BEUNINGEN, A., JANSE, J., COENEN, T., TERMORSHUIZEN, A., VAN BRUGGEN, A. & BLOK, W. Biological Soil Disinfestation (BSD), a new control method for potato brown rot, caused by *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *European Journal of Plant Pathology* 117:403-415. 2007.
- MOURA, A. & ROMEIRO, R.S. Meio seletivo para *Ralstonia solanacearum* baseado na resistência múltipla natural a antibióticos. *Fitopatologia Brasileira* 23:466-470. 1998.
- NESMITH, W.C. & JENKINS JR., S.F. A selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum* from soil. *Phytopathology* 69:182-185. 1979.
- OLIVIER, A.R., UDA, Y., BANG, S.W., HONJO, H., FUKAMI, M. & FUKUI, R. Dried Residues of Specific Cruciferous Plants Incorporated into Soil can Suppress the Growth of *Ralstonia solanacearum*, Independently of Glucosinolate Content of the Residues. *Microbes and Environments* 21:216-226. 2006.
- PRADHANANG, P.M., ELPHINSTONE, J.G. & FOX, R.T.V. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathology* 49:414-422. 2000.
- PRIOU, S., GUTARRA, L. & ALEY, P. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. *Plant Pathology* 55:36-45. 2006.
- ROMEIRO, R.S. Bactérias Fitopatogênicas (2th). Viçosa: UFV. 417p. 2005.

- SANTOS, B.M., GILREATH, J.P., MOTIS, T.N., NOLING, J.W., JONES, J.P. & NORTON, J.A. Comparing methyl bromide alternatives for soilborne disease, nematode and weed management in fresh market tomato. *Crop Protection* 25:690-695. 2006.
- SCHAAD, N.W., JONES, J.B. & CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3th). Minnesota: American Phytopathological Society. 373p. 2001.
- SHIN, I.S., MASUDA, H. & NAOHIDE, K. Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Food Microbiology* 94:255-261. 2004.
- SILVEIRA, N.S.S.D., MARIANO, R.D.L.R. & MICHEREFF, S.J. *Pseudomonas solanacearum* no Brasil. *Summa Phytopathologica* 22:97-111. 1996.
- SMITH, B.J. & KIRKEGAARD, J.A. In vitro inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology* 51:585-593. 2002.
- SONG, L., MORRISON, J.J., BOTTING, N.P. & THORNALLEY, P.J. Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC-MS/MS. *Analytical Biochemistry* 347:234-243. 2005.
- SPOONER, D.M., ANDERSON, G.J. & JANSEN, R.K. Chloroplast DNA Evidence for the Interrelationships of Tomatoes, Potatoes, and Pepinos (Solanaceae). *American Journal of Botany* 80:676-688. 1993.
- TAVARES, L.A., MICHEREFF, S.J., SOUZA, R.M. & MARIANO, R.L.M. Análise de solo para detecção de risco de infecção de tomateiro por *Ralstonia solanacearum*. *Summa Phytopatologica* 26:311-316. 2000.
- TAYLOR, I.B. Biosystematics of the tomato. In: ATHERTON, J.G. & RUDICH, J. (Eds.) *The tomato crop: a scientific basis for improvement*. Springer. 1986.
- TIERENS, K.F.M.J., THOMMA, B.P.H.J., BROUWER, M., SCHMIDT, J., KISTNER, K., PORZEL, A., MAUCH-MANI, B., CAMMUE, B.P. & BROEKAERT, W.F. Study of the Role of Antimicrobial Glucosinolate-Derived Isothiocyanates in Resistance of Arabidopsis to Microbial Pathogens. *Plant Physiology* 125:1688-1699. 2001.
- VAN DER WOLF, J.M., VRIEND, S.G.C., KASTELEIN, P., NIJHUIS, E.H., VAN BEKKUM, P.J. & VAN VUURDE, J.W.L. Immunofluorescence Colony-staining (IFC) for Detection and Quantification of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* Biovar 2 (Race 3) in Soil and Verification of Positive Results by PCR and Dilution Plating. *European Journal of Plant Pathology* 106:123-133. 2000.
- WANG, J.F. & LIN, C.H. Integrated management of tomato bacterial wilt. AVRDC. 16p. 2005.
- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., OYAIZU, H., YANO, I., HOTTA, H., HASHIMOTO, Y., EZAKI, T. & ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the types species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. *Microbiology Immunology* 36:1251-1275. 1992.
- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia*

solanacearum (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb Nov. Microbiology Immunology 39:897–904. 1995.

ZASADA, I.A. & FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to Isothiocyanates in Laboratory Assays. Phytopathology 93:747. 2003.

CAPÍTULO 1

MEIOS SELETIVOS PARA A DETECÇÃO E A QUANTIFICAÇÃO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Ralstonia solanacearum* NO SOLO

RESUMO

O uso de meios seletivos para a detecção e a quantificação da população de *Ralstonia solanacearum* no solo tem apresentado eficácia variável, pois muitas vezes só funcionam perfeitamente para os isolados utilizados na sua confecção. Desta forma, buscou-se avaliar a eficiência de diferentes meios seletivos elaborados para a detecção de *R. solanacearum* no solo, utilizando-se isolados provenientes de diferentes regiões do Brasil. Os meios seletivos foram avaliados quanto a sensibilidade, índice de repressão ao patógeno alvo, capacidade de supressão de microrganismos contaminantes e taxa de recuperação da bactéria no solo. Apenas dois dos meios avaliados apresentaram sensibilidade adequada para detecção de *R. solanacearum* no solo, sendo capazes de detectar a bactéria em concentrações de 10^3 ufc/grama de solo. Dentre os meios avaliados, o meio Selective Medium South Africa - Elphinstone (SMSA-E) foi eficiente em suprimir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes, apresentando o menor índice de repressão à *R. solanacearum* e a maior taxa de recuperação da bactéria no solo.

SELECTIVE MEDIUMS FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF THE BRAZILIAN STRAINS OF *Ralstonia solanacearum* IN THE SOIL

ABSTRACT

The use of selective mediums for detection and quantification of *Ralstonia solanacearum* population in the soil had showed variable effectiveness and these mediums only worked perfectly for the strains that were used on it elaboration. In other case, it had looked for to evaluate the efficiency of the different selective mediums elaborated for the detection of Brazilian strains of *R. solanacearum*. The selective mediums were evaluated as the sensibility, repression index of *R. solanacearum*, capacity of suppression of background microorganisms and recovery tax of the *R. solanacearum* in the soil. Only two of the evaluated mediums showed appropriate sensibility for detection of *R. solanacearum* in the soil, being capable to detect the bacteria in concentrations of 10^3 cfu/gram of soil. Among the evaluated mediums, the Selective Medium South Africa - Elphinstone (SMSA-E) was efficient in suppressing the background microorganisms development, showing the low repression index to *R. solanacearum* and the high bacterial recovery tax in the soil.

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* 1996, causadora de murcha bacteriana em diversas espécies vegetais, é um microrganismo extremamente adaptado ao solo (Hayward, 1991; Romeiro, 2005). Acredita-se que esta bactéria era originalmente apenas um organismo saprófita habitante do solo e que se tornou fitopatogênico devido aos anos de co-evolução com as espécies hospedeiras (Buddenhagen & Kelman, 1964). Desta forma, trabalhos na área de controle ou epidemiologia, que visem estudar a flutuação populacional de *R. solanacearum* no solo dependem de técnicas que sejam capazes de detectar e quantificar a bactéria neste ambiente. O uso de plantas indicadoras (método indireto), técnicas moleculares, sorológicas, e o uso de meios seletivos (métodos diretos) são alternativas para a detecção e a quantificação da bactéria no solo.

Os métodos indiretos de detecção de bactérias no solo foram os primeiros a serem utilizados para este fim. Entretanto, existe certa resistência em utilizá-los, pois requerem considerável período de tempo e seus resultados são bastante imprecisos (Jenkins *et al.*, 1967; Pradhanang *et al.*, 2000). Isto faz com que, apesar do grande potencial como sistema de previsão da doença, estes bioensaios sejam pouco utilizados nos trabalhos com *R. solanacearum* (Tavares *et al.*, 2000). Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia de polimerase (PCR) tem grande potencial, apresentando-se como uma técnica sensível e específica nos trabalhos em que foi utilizada na detecção e quantificação de *R. solanacearum* no solo (Ito *et al.*, 1998; Poussier *et al.*, 2002; Pradhanang *et al.*, 2000; S. Ito, 1998). Mas, o custo significativo desta técnica, aliada a falta de estrutura apropriada em determinadas instituições de pesquisa e ao fato de que determinados compostos presentes no solo são inibidores desta reação, limitam a sua utilização, sendo este método executado atualmente apenas para calibrar técnicas de custo mais baixo (Ito *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 1992; Van Der Wolf *et al.*, 2000). O uso de métodos sorológicos também vem sendo avaliado como forma de se detectar *R. solanacearum* no solo (Jenkins *et al.*, 1967; Pradhanang *et al.*, 2000; Priou *et al.*, 2006). Embora útil em avaliações de grande número de amostras, por ser de custo relativamente baixo e de fácil execução, métodos sorológicos, como o ELISA, só apresentam eficácia quando a população da bactéria excede 10^4 ufc (unidades formadoras de colônias)/g de solo. Sendo assim, não apresenta a sensibilidade requerida para estudos epidemiológicos, é

potencialmente propensa a dar reações falso-positivas e dificilmente pode ser utilizado para quantificação (Elphinstone *et al.*, 1996; Pradhanang *et al.*, 2000).

O uso de meios seletivos é o método de detecção direta de bactérias no solo mais conhecido e utilizado, o qual consiste no semeio de extratos do solo diluídos, onde contaminantes (todos os organismos que não o desejado) não conseguem se desenvolver, ou o fazem em ritmos mínimos, sendo que apenas o organismo desejado apresenta-se desenvolvido e em condições de identificação e quantificação (Priou *et al.*, 2006). A grande aceitabilidade deste método pode ser um reflexo da sua praticidade, sensibilidade e especificidade, associados a um baixo custo e precisa quantificação de populações viáveis no solo (Pradhanang *et al.*, 2000). Entretanto, um grande empecilho para a utilização de meios seletivos é o fato de estes apresentarem eficácia variável, pois muitas vezes só funcionam perfeitamente para os isolados utilizados na sua confecção (Priou *et al.*, 2006), e por este motivo tem o seu uso limitado.

No decorrer dos anos, vários meios seletivos para *R. solanacearum* foram desenvolvidos nas diversas regiões do mundo. No Brasil, podemos citar o meio desenvolvido por Moura & Romeiro (1998), o qual teve sua eficiência avaliada para diversos isolados provenientes de várias regiões do mundo. Entretanto, tendo em vista a variabilidade na eficiência destes meios com relação a diferentes isolados, torna-se interessante avaliar a eficácia de outros meios em relação a isolados provenientes do Brasil.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de diversos meios seletivos relatados na literatura para a detecção e a quantificação de *R. solanacearum* no solo, utilizando isolados provenientes de diversas regiões brasileiras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção, padronização e preservação dos isolados de *Ralstonia solanacearum*.

Isolados de *R. solanacearum*, biovars 1, 2 e 3 (Tabela 1), foram adquiridos por meio de coletas e doações, sendo oriundos de diferentes localidades do Brasil. Estes foram inoculados em plantas de tomateiro cv. Santa Clara e posteriormente

reisolados, a fim de eliminar diferenças de idade e averiguar a sua patogenicidade. O método adotado para inoculação das plantas foi o de imersão de raízes em suspensão bacteriana (Schaad *et al.*, 2001). Depois de evidenciados os sintomas de murcha nas plantas inoculadas, efetuou-se o isolamento da bactéria, sendo os isolados preservados em tubos contendo água estéril e por criopreservação em glicerina 40% à -80°C.a

Tabela 1 – Isolados de *Ralstonia solanacearum* utilizados na avaliação dos diferentes meios seletivos quanto à detecção e a quantificação da bactéria no solo.

Código	Origem	Hospedeiro	Biovar
1	Ervália – MG	Tomate	1
2	Coimbra – MG	Tomate	1
3	Cruz das Almas – BA	Tomate	2
4	Cruz das Almas – BA	Berinjela	2
5	Rio de Janeiro – RJ	Tomate	3
6	Brasília – DF	Tomate	1

2.2. Calibração da concentração de inóculo.

Para preparo de inóculo, os isolados foram semeados em meio CPG (Casamino acid Peptone Glucose) (Kelman, 1954) e incubados a 28±1 °C por 48 horas. Decorrido este tempo as bactérias foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e a turbidez da suspensão foi ajustada para O.D.₆₀₀ = 0,1 em espectrofotômetro Spectronic 20®, o que equivale aproximadamente à 1x10⁸ ufc/mL (Schaad *et al.*, 2001). Esta suspensão inicial foi diluída dependendo da concentração desejada nos trabalhos.

2.3. Sensibilidade dos meios seletivos.

Foram avaliados os meios Selective Medium (SM), Final Selective Medium (FSM), Selective Medium 1 (SM-1), Potato Crystal violet Chloramphenicol Gellan gum (PCCG) e Selective Medium South Africa - Elphinstone (SMSA-E). A elaboração destes seguiu o protocolo descrito nos trabalhos originais (Elphinstone *et al.*, 1996; Granada & Sequeira, 1983; Hara *et al.*, 1995; Karganilla & Buddenhagen,

1972; Nesmith & Jenkins Jr., 1979) (Apêndice). Após a adição dos meios em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e 15 mm de altura, estas foram subdivididas externamente em seis seções, sendo em cada uma destas semeado 5 µL de um isolado distinto da bactéria. Cada isolado foi semeado a partir de suspensões nas concentrações 1×10^6 , 1×10^4 e 1×10^2 ufc/mL. As placas foram mantidas a 28 ± 1 e, após 96 horas, avaliou-se a presença ou não de crescimento bacteriano nas placas contendo os meios seletivos. O meio TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) (Kelman, 1954) foi adotado como meio padrão para o cultivo dos isolados. Avaliou-se também o desenvolvimento dos isolados nos meios seletivos, sem a adição de substâncias antimicrobianas.

2.4. Determinação do índice de repressão (IR) dos meios seletivos.

Foi escolhido o isolado capaz de se desenvolver na maioria dos meios. Uma cultura deste isolado foi incubada por 72 horas a 28 ± 1 °C e depois suspensa em solução salina (0,85%) estéril, acrescida de 0,5% do surfactante Tween 80. A suspensão foi ajustada para as concentrações de 1×10^4 , 1×10^3 e 1×10^2 ufc/mL, utilizando solução salina estéril contendo Tween 80. Uma alíquota de 100 µL de cada concentração foi depositada em placas de Petri contendo os diversos meios e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Logo após as placas foram mantidas a 28 ± 1 °C. Fez-se a contagem do número de colônias bacterianas em cada placa após 24, 48 e 72 horas. O IR (percentual de inibição do crescimento do organismo alvo) dos meios seletivos foi determinado dividindo-se o valor obtido pela diferença entre o número de colônias do meio padrão e do meio seletivo dentro de uma mesma diluição, pelo número de colônias no meio padrão, e multiplicando-se o resultado por 100. Foram utilizados apenas os meios que possibilitaram o desenvolvimento dos isolados no experimento 2.3.

2.5. Determinação do índice de supressão (IS) dos meios seletivos.

Amostras de 10 gramas de solo peneirado (malha de 2 mm) proveniente do campo foram suspendidas em 100 mL de solução salina estéril, acrescida de 0,5% de Tween 80, seguida de agitação à 150 rpm por 30 minutos. A suspensão foi, então, diluída em série de 10^{-1} a 10^{-5} , também em solução salina estéril contendo Tween 80.

Uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi depositada em placas de Petri contendo os diversos meios. Esta alíquota foi depositada e espalhada com o auxílio de uma alça calibrada de 10 µL. Logo após, as placas foram mantidas a 28±1 °C. Após 24, 48 e 72 horas, foi realizada a avaliação do crescimento de microrganismos contaminantes. O IS (inibição do crescimento de contaminantes) dos meios seletivos foi determinado dividindo-se o valor obtido pela diferença entre o número de colônias de organismos contaminantes do meio padrão e do meio seletivo dentro de uma mesma diluição, pelo número de colônias de organismos contaminantes no meio padrão, e multiplicando-se o resultado por 100. Foram utilizados apenas os meios que possibilitaram o desenvolvimento dos isolados no experimento 2.3.

2.6. Determinação da taxa de recuperação de *Ralstonia solanacearum* do solo.

Em Erlenmeyers de 250 mL, foram colocados 10 gramas de solo peneirado (malha de 2 mm) proveniente do campo. Foi escolhido o isolado que se desenvolveu na maioria dos meios. Uma cultura deste isolado foi incubada por 48 horas a 28±1 °C e depois suspensa em solução salina (0,85%) estéril, acrescida de 0,5% de Tween 80. Às alíquotas de solo, foi adicionado 1 mL da suspensão bacteriana nas concentrações 1x10⁸, 1x10⁶ e 1x10⁴ ufc/mL, sendo que a mistura final correspondeu à aproximadamente 1x10⁷, 1x10⁵ e 1x10³ ufc/g de solo, respectivamente. Passados 30 minutos, adicionou-se solução salina estéril contendo Tween 80 até se obter um volume total de 100 mL. A suspensão foi agitada à 150 rpm por 30 minutos e, então, diluída em série de 10⁻¹ a 10⁻⁵, também em solução salina estéril contendo Tween 80. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi depositada em placas contendo os diversos meios seletivos. Esta alíquota foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Logo após as placas foram mantidas a 28±1 °C. Procedeu-se a contagem do número de colônias nos meios seletivos após 24, 48 e 72 horas de incubação. A taxa de recuperação de cada meio foi determinada dividindo-se o número de unidades formadoras de colônias estimadas pelo meio, pelo número total adicionado ao solo e multiplicando-se o resultado por 100. Foram utilizados apenas os meios que possibilitaram o desenvolvimento dos isolados no experimento 2.3.

2.7. Local de realização da pesquisa e análises estatísticas.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. Algumas análises foram realizadas em esquema fatorial. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas efetuadas neste trabalho foram realizadas utilizando o procedimento PROC GLM do programa estatístico SAS 9.1 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC). Todos os experimentos foram realizados duas vezes para averiguar a repetibilidade dos resultados observados.

3. RESULTADOS

3.1. Sensibilidade dos meios seletivos.

Observou-se o crescimento de todos os isolados no meio TTC e nos meios sem a adição de substâncias antimicrobianas. Quando da adição de substâncias antimicrobianas, apenas os meios SM e SMSA-E possibilitaram o desenvolvimento dos isolados de *R. solanacearum* nas concentrações de 10^6 , 10^4 e 10^2 ufc/mL (Tabela 2). Não houve seletividade dos meios em função dos isolados, observando-se apenas variações na intensidade e velocidade do crescimento bacteriano. As primeiras colônias nos meios seletivos puderam ser observadas a partir de 24 horas de incubação. As colônias nos meios SM e SMSA-E apresentaram-se de coloração branca, ou branca com o centro avermelhado. No meio SMSA-E, estas foram semelhantes àquelas encontradas no meio TTC, apresentando aspecto mucóide e bordos irregulares. Já no meio SM, estas apresentaram menor tamanho em relação àquele observado no meio padrão e bordos mais regulares. Observou-se claramente um menor desenvolvimento das colônias no meio SM em relação ao meio SMSA-E.

3.2. Determinação do índice de repressão (IR) dos meios seletivos.

O meio seletivo SMSA-E apresentou baixos índices de repressão em todas as concentrações avaliadas (Tabela 3), diferente do observado no meio seletivo SM, o qual apresentou um alto índice de repressão, impedindo o crescimento de *R. solanacearum* em concentrações inferiores a 1×10^4 ufc/mL. A diferença entre os dois meios quanto ao índice de repressão foi significativa (Tukey, $P \leq 0,05$). O número máximo de colônias foi observado com 48 horas de incubação, não havendo aumento deste valor com 72 horas de incubação. Não houve efeito significativo da concentração de inóculo sobre os valores dos índices de repressão observados (Tukey, $P \leq 0,05$).

Tabela 2 – Desenvolvimento dos isolados de *Ralstonia solanacearum* semeados em diferentes concentrações de suspensão bacteriana em meios seletivos com ou sem a adição de antimicrobianos após 72 horas de incubação.

Isolados	Inóculo (ufc/mL)	TTC	Meios seletivos									
			SM		FSM		SM-1		SMSA-E		PCCG	
			C ¹	S ²	C	S	C	S	C	S	C	S
1	10^6	+	+ ³	+	- ⁴	+	-	+	+	+	-	+
	10^4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
2	10^6	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
3	10^6	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
4	10^6	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
5	10^6	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
6	10^6	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	10^2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+

¹Com adição de antimicrobianos. ²Sem adição de antimicrobianos. ³Presença de crescimento bacteriano. ⁴Ausência de crescimento bacteriano.

3.3. Determinação do índice de supressão (IS) dos meios seletivos.

Ao se avaliar os resultados dos índices de supressão, observou-se interação significativa (Tukey, $P \leq 0,05$) entre o tempo de incubação e os diferentes meios seletivos. Nos tempos de incubação de 24 e 48 horas, não houve diferença significativa entre os meios quanto à supressão de microrganismos contaminantes. Entretanto, após 72 horas de incubação as médias dos índices de supressão dos meios SM e SMSA-E foram estatisticamente distintas. Os valores de IS obtidos com o meio SM em todos os tempos de incubação estudados não apresentaram diferenças significativas. Já no meio SMSA-E, o valor médio do IS apresentado após 72 horas de incubação foi significativamente diferente dos valores apresentados nos demais tempos de incubação.

Tabela 3 – Índices de repressão (IR) ao isolado 1 de *Ralstonia solanacearum* apresentado pelos meios seletivos SM e SMSA-E com 72 horas de incubação.

	Tempo de Incubação	Meios seletivos	
		SM	SMSA-E
IS (%)	24 horas	100 aA ¹	100 aA
	48 horas	100 aA	99,97 aA
	72 horas	99,99 aA	99,77 bB

¹Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (Tukey, $P \leq 0,05$).

Tabela 4 – Índices de supressão (IS) aos microrganismos contaminantes apresentados pelos meios seletivos SM e SMSA-E após diferentes períodos de incubação.

	Concentração do inóculo	Meios seletivos	
		SM	SMSA-E
IR (%)	10^4 ufc/mL	92,57	0,63
	10^3 ufc/mL	92,10	14,68
	10^2 ufc/mL	9,99	0
	Média	94,85 a ¹	5,1 b

¹Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem significativamente (Tukey, $P \leq 0,05$).

3.4. Determinação da taxa de recuperação de *Ralstonia solanacearum* do solo.

A análise dos dados neste experimento levou em consideração a contagem do número de colônias realizada após 48 horas de incubação, pois nos experimentos anteriores, não se observou um aumento no surgimento de colônias nos meios seletivos a partir deste período. Além disso, períodos maiores de incubação resultam em um maior número de organismos contaminantes, o que dificulta a contagem das colônias de *R. solanacearum*. A concentração da bactéria no solo teve influência significativa na taxa de recuperação (Tukey, $P \leq 0,05$). Entretanto, a interação entre a concentração da bactéria e os meios seletivos foi não significativa (Tukey, $P \leq 0,05$). Quando a concentração da bactéria no solo foi de 1×10^7 ufc/g de solo, observou-se maiores taxas de recuperação de *R. solanacearum* em relação aos tratamentos onde a concentração da bactéria era menor (Tabela 5). O meio SMSA-E apresentou maior taxa de recuperação da bactéria em relação ao meio SM, sendo a diferença entre eles significativa (Tukey, $P \leq 0,05$). Entretanto, a taxa de recuperação de ambos foi baixa, com valores médios de 40,55 e 14,08 para os meios SMSA-E e SM, respectivamente.

Tabela 5 – Taxa de recuperação (%) de *Ralstonia solanacearum* de solo infestado, apresentando diferentes concentrações da bactéria, pelos meios seletivos avaliados.

Meios	Concentração bacteriana no solo (ufc/g de solo)			Média
	10^7	10^5	10^3	
SMSA-E	51,93	29,29	40,44	40,55 a ¹
SM	32,97	7,15	2,13	14,08 b
Média	42,45 a	18,22 b	21,28 ab	

¹Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (Tukey, $P \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A base de todos os meios seletivos estudados possibilitou o desenvolvimento dos isolados de *R. solanacearum*. Sendo assim, a inibição no desenvolvimento da bactéria por alguns destes deve-se à composição e combinação das substâncias antimicrobianas adicionadas aos mesmos. A alta concentração de cloreto de trifetil-

tetrazolium no meio FSM pode ser uma das justificativas para a inibição dos isolados avaliados. Nesmith & Jenkins Jr. (1979) relataram que diversos isolados de *R. solanacearum* foram sensíveis a este sal em concentrações acima de 500 mg/L. Vale ressaltar que o meio FSM possui a maior concentração do sal dentre os meios avaliados. Outro aspecto importante é que este meio foi desenvolvido utilizando-se apenas um isolado de *R. solanacearum*, oriundo da Carolina do Norte (EUA). Quando foi avaliado o desenvolvimento de outros isolados, oriundos de outras regiões, muitos isolados, inclusive alguns sul-americanos originados da Colômbia, foram totalmente inibidos. Isolados que não foram inibidos somente apresentaram crescimento quando semeados em concentrações de inóculo acima de 10^5 ufc/mL.

Sabendo-se que *R. solanacearum* apresenta uma grande variabilidade, tendo-se, inclusive, evidências de que esta constitui um complexo de espécies (Guidot *et al.*, 2007), a elaboração de um meio seletivo para esta bactéria deve utilizar o maior número possível de isolados, para que este meio possa ser eficiente, independente do local onde seja utilizado.

O meio SM-1 se diferencia dos outros principalmente por apresentar o antimicrobiano timerosal na sua composição. A utilização desta substância pode ter ocasionado a inibição da bactéria neste meio, pois Granada & Sequeira (1983) verificaram que isolados oriundos do Japão foram sensíveis ao timerosal, podendo este inibir isolados de outras regiões também. Além do mais, no trabalho que descreve a elaboração do meio, é citado que este apresentou índices de repressão relativamente altos (80%), dependendo dos isolados avaliados, além de inibir significativamente ou drasticamente isolados das raças 2 e 3.

Todos os meios avaliados contêm o antibiótico cloranfenicol e o meio PCCG é o que contém a concentração mais alta deste produto (7,5mg/L). Conforme Granada & Sequeira (1983) e Romeiro *et al.* (1998), isolados de *R. solanacearum* mostraram-se sensíveis a este antibiótico. Desta forma, uma maior concentração pode inibir o desenvolvimento da bactéria. É válido ressaltar que, nem sempre a inibição no desenvolvimento de um microrganismo deve-se exclusivamente à ação de um único agente antimicrobiano, sendo que a combinação de substâncias, as quais a bactéria é insensível, pode vir a inibir o seu desenvolvimento.

Karganilla & Buddenhagen (1972) observaram que as colônias de *R. solanacearum* desenvolvidas no meio SM apresentavam-se menores e menos fluidas que as presentes no meio TTC, o que foi semelhante aos resultados obtidos no

presente estudo. Nesmith *et al.* (1979) atribuem esta característica à combinação de agentes antimicrobianos, pois mesmo no meio TTC, a adição destes originou colônias com aspectos similares. Esta característica pode interferir na diferenciação entre as colônias virulentas e as colônias avirulentas de *R. solanacearum*, bem como de outras bactérias contaminantes. A base do meio SM apresenta sua composição bastante diferenciada dos demais meios seletivos avaliados, pois foi elaborada para atender as necessidades nutricionais de *R. solanacearum*, favorecendo o seu desenvolvimento. Isso pode ter possibilitado um melhor desenvolvimento dos isolados da bactéria neste meio em comparação aos demais, excetuando-se o meio SMSA-E, onde o crescimento foi visivelmente mais abundante. O meio SMSA-E apresenta a base semelhante ao meio TTC e, provavelmente por isso, as colônias desenvolvidas em ambos os meios apresentam aparência semelhante. Elphinstone *et al.* (1996) e Pradhanang *et al.* (2000) também mencionam a semelhança entre as colônias formadas no meio SMSA-E e no meio TTC. As características das colônias nesses dois meios nos permitem diferenciar *R. solanacearum* de possíveis contaminantes. O meio SMSA-E apresenta o menor número e as menores concentrações de agentes antimicrobianos dentre os meios avaliados, diminuindo o seu potencial de inibição da bactéria, o que torna coerente o fato do meio ter propiciado melhor desenvolvimento dos isolados avaliados.

O índice de repressão observado para o meio SM foi bastante superior ao índice de 37% obtido por Karganilla & Buddenhagen (1972). Isto pode ter acontecido em decorrência do meio ter sido elaborado utilizando apenas um isolado de *R. solanacearum*. Desta forma o meio, bastante específico ao isolado para o qual foi criado, pode reprimir o desenvolvimento de outros isolados da bactéria. Vários autores descrevem o meio SM como apropriado apenas para certos isolados e de baixa eficiência na detecção de *R. solanacearum* (Granada & Sequeira, 1983; Moura & Romeiro, 1998; Nesmith & Jenkins Jr., 1979). Outro aspecto importante deste meio é que a utilização de manitol como fonte de carbono o torna apropriado apenas para isolados dos biovars 3 e 4, capazes de crescer quando esta for a única fonte de carbono. Sendo assim, isolados de outros biovars, que não possuem esta propriedade, podem não se desenvolver no meio SM.

No presente trabalho, isolados dos biovars 1 e 2, os quais não são capazes de crescer em meio onde o manitol é única fonte de carbono, apresentaram algum nível de desenvolvimento no meio SM. Levando-se em consideração que a elaboração do

meio prevê a autoclavagem de todos os componentes de sua base, é provável que este processo tenha clivado pequenas quantidades do açúcar, o que possibilitaria o crescimento dos isolados pertencentes aos referidos biovares.

No meio SMSA-E são utilizados poucos agentes antimicrobianos e em concentrações menores, em comparação com os demais meios. O antibiótico utilizado em maior concentração é o sulfato de polimixina B, ao qual *R. solanacearum* possui resistência constitutiva (Romeiro *et al.*, 1998). A adição deste antibiótico é aconselhável na elaboração de qualquer meio seletivo para esta bactéria, pois ele auxilia na inibição de outras bactérias gram negativas, que estejam presentes no solo. Desta forma, é compreensível o melhor desempenho do meio SMSA-E em relação aos demais, sendo o IR e o tempo para surgimento de 100% das colônias semelhantes aos encontrado por Pradhanang *et al.* (2000).

Ambos os meios SM e SMSA-E são descritos como eficientes em inibir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes do solo (Elphinstone *et al.*, 1996; Karganilla & Buddenhagen, 1972; Pradhanang *et al.*, 2000), com índices de supressão acima de 80%. No presente trabalho, o aparecimento de contaminantes não foi prejudicial à detecção da bactéria, pois este só ocorreu em abundância a partir de 72 horas de incubação. Levando-se em consideração que a partir de 48 horas de incubação, o surgimento de novas colônias de *R. solanacearum* é praticamente nulo, o aparecimento de contaminantes a partir desse período já não interfere com a quantificação da bactéria.

As taxas de recuperação de *R. solanacearum* observadas nos meios SM e SMSA-E foram muito baixas, com médias inferiores à 50%. Diversos são os fatores que podem prejudicar a recuperação de fitobactérias no solo. Microrganismos saprófitas habitantes do solo podem interferir significativamente na recuperação da bactéria alvo. Pradhanang *et al.* (2000) realizaram um estudo sobre a interferência de uma bactéria saprofítica isolada do solo sobre a recuperação de *R. solanacearum*. Eles esterilizaram o solo e o infestaram com suspensão das duas bactérias em diferentes concentrações. A taxa de recuperação de *R. solanacearum* era de 90% quando a concentração desta era maior, mas decrescia para zero quando a bactéria saprófita se encontrava em concentração próxima ou maior no solo esterilizado.

Outro aspecto que também dificulta a recuperação eficiente de bactérias do solo é o fato destes microrganismos tenderem a ficar muito aderidos na matéria orgânica (Jenkins *et al.*, 1967). Além disso, parte das células bacterianas pode entrar

em estádios não cultiváveis, denominados VBNC (viable but not countable) (Grey & Steck, 2001; Pradhanang *et al.*, 2000), impossibilitando sua detecção pelo uso de meios seletivos. O principal fator a contribuir para uma boa recuperação da bactéria alvo do solo é a eficiência do método de extração (Pradhanang *et al.*, 2000), ainda mais quando se utiliza meios com baixo IR e alto IS, como o observado para o meio SMSA-E. Diversos métodos de extração de *R. solanacearum* do solo podem ser encontrados na literatura (Moura & Romeiro, 1998; Pradhanang *et al.*, 2000; Pradhanang *et al.*, 2003), os quais podem ser testados futuramente, buscando-se melhores resultados do que os obtidos com o método empregado neste estudo.

De qualquer modo, o meio SMSA-E apresentou os melhores resultados no que diz respeito ao índice de repressão e à taxa de recuperação, demonstrando sensibilidade suficiente para detectar a bactéria no solo em concentrações de até 10^3 ufc/g de solo. Dos meios seletivos avaliados, o meio SMSA-E é aquele citado em um maior número de trabalhos, como ferramenta eficaz na avaliação da população de *R. solanacearum* no solo. Este meio já foi utilizado com eficiência em estudos com isolados da bactéria das raças 1 e 3, de vários biovars, provenientes da Espanha, Itália, Reino Unido, África do Sul, Nepal, Estados Unidos e Holanda (Caruso *et al.*, 2005; Di Bisceglie *et al.*, 2005; Elphinstone *et al.*, 1996; French *et al.*, 1995; Pradhanang *et al.*, 2000; Pradhanang *et al.*, 2003; Van Der Wolf *et al.*, 2000). Isto mostra que este meio permite o crescimento de isolados de *R. solanacearum* oriundos de diversas regiões do globo, suplantando o principal problema da utilização de meios seletivos, que é o fato de que muitas vezes estes só funcionam perfeitamente para os isolados utilizados na sua elaboração (Priou *et al.*, 2006). Segundo Pradhanang *et al.* (2000), este é o principal motivo pelo qual os meios SM, FSM e SM-1 não são amplamente utilizados, pois são potencialmente propensos a resultados falso-negativos. Outra vantagem do meio SMSA-E é a facilidade de preparo, o que também é considerado um gargalo à utilização de determinados meios (Granada & Sequeira, 1983; Moura & Romeiro, 1998).

O índice de repressão apresentado pelo meio SMSA foi bem menor que o descrito para o meio seletivo desenvolvido por Moura & Romeiro (1998). Apesar de ter sido avaliado para um grande número de isolados de *R. solanacearum* do Brasil e do mundo, os resultados obtidos por estes autores apontam para índices de repressão superiores à 75%, dependendo da diluição. Assim, o conhecimento sobre o potencial

de outros meios seletivos em trabalhos com esta bactéria no Brasil torna-se de grande interesse.

Nos estudos de populações de *R. solanacearum* no solo, os meios seletivos apresentam-se como ferramentas de grande importância e com propriedades únicas, visto a capacidade de detectar e quantificar populações viáveis da bactéria no solo, sendo ainda uma técnica de baixo custo (Pradhanang *et al.*, 2000). Embora seja necessária a avaliação de um número maior de isolados de outras regiões brasileiras, o fato do meio SMSA-E ser utilizado com eficiência em diferentes localidades do mundo e de ter apresentado resultados satisfatórios com os isolados aqui estudados, demonstra o seu potencial de uso em estudos de populações de *R. solanacearum* no Brasil. O meio SMSA-E mostra-se adequado para estudos epidemiológicos com níveis de sensibilidade suficientes para se monitorar a ocorrência e a sobrevivência de *R. solanacearum* no solo. Entretanto, por apresentar uma baixa taxa de recuperação, é aconselhável o uso combinado com outros métodos, o que pode gerar resultados mais precisos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUDDENHAGEN, I. & KELMAN, A. Biological and Physiological Aspects of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 2:203-230. 1964.
- CARUSO, P., PALOMO, J.L., BERTOLINI, E., ALVAREZ, B., LOPEZ, M.A. & BIOSCA, E.G. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. Applied and Environmental Microbiology 71:140-148. 2005.
- DI BISCEGLIE, D.P., SACCARDI, A., GIOSUE, S., TRAVERSA, F. & MAZZUCCHI, U. Survival of *Ralstonia solanacearum* on wood, high density polyethylene and on jute fabric in cold storage. Journal of Plant Pathology 87:145-147. 2005.
- ELPHINSTONE, J.G., HENNESSY, J., WILSON, J.K. & STEAD, D.E. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26:663-678. 1996.
- FRENCH, E.B., GUTARRA, L., ALEY, P. & ELPHINSTONE, J. Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. Fitopatologia 30:126-130. 1995.
- GRANADA, G.A. & SEQUEIRA, L. A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. Plant Disease 67:1084-1088. 1983.

- GREY, B.E. & STECK, T.R. The Viable But Nonculturable State of *Ralstonia solanacearum* May Be Involved in Long-Term Survival and Plant Infection. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3866-3872. 2001.
- GUIDOT, A., PRIOR, P., SCHOENFELD, J., CARRERE, S., GENIN, S. & BOUCHER, C. Genomic Structure and Phylogeny of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Inferred from Gene Distribution Analysis. *The Journal of Bacteriology* 189:377-387. 2007.
- HARA, H., KOGA, K. & TANAKA, H. Medium for quantitative isolation of *Pseudomonas solanacearum*. *Annual of Phytopathological Society of Japan* 61:255. 1995.
- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:65-87. 1991.
- ITO, S., USHUIA, Y., FUJII, T., TANAKA, S., KAMEYA-IWAKI, M., YOSHIWARA, S. & KISHI, F. Detection of Viable Cells of *Ralstonia solanacearum* in Soil Using a Semiselective Medium and a PCR Technique. *Journal of Phytopathology* 146:379-384. 1998.
- JENKINS, S.F., MORTON JR, D.J. & DUKES, P.D. Comparassion of techniques for detection of *Pseudomonas solanaceraum* in artificially infested soil. *Phytopathology* 57:25-27. 1967.
- KARGANILLA, A.D. & BUDDENHAGEN, I.W. Development of a selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 62:1373-1376. 1972.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695. 1954.
- MOURA, A. & ROMEIRO, R.S. Meio seletivo para *Ralstonia solanacearum* baseado na resistência múltipla natural a antibióticos. *Fitopatologia Brasileira* 23:466-470. 1998.
- NESMITH, W.C. & JENKINS JR., S.F. A selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum* from soil. *Phytopathology* 69:182-185. 1979.
- PICARD, C., PONSONNET, C., PAGET, E., NESME, X. & SIMONET, P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Amplified and Environmental Microbiology* 58:2717-2722. 1992.
- POUSSIER, S., CHÉRON, J.-J., COUTEAU, A. & LUISETTI, J. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *Journal of Microbiological Methods* 51:349-359. 2002.
- PRADHANANG, P.M., ELPHINSTONE, J.G. & FOX, R.T.V. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathology* 49:414-422. 2000.
- PRADHANANG, P.M., MOMOL, M.T., OLSON, S.M. & JONES, J.B. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Disease* 87:423-427. 2003.

PRIOU, S., GUTARRA, L. & ALEY, P. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. *Plant Pathology* 55:36-45. 2006.

ROMEIRO, R.S. Bactérias Fitopatogênicas (2th). Viçosa: UFV. 417p. 2005.

ROMEIRO, R.S., MOURA, A., OLIVEIRA, J.R., SILVA, H.S.A., BARBOSA, L.S., SOARES, F.M.P. & PERES, F. Evidences of constitutive multiple resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. *Summa Phytopatologica* 24:220-225. 1998.

SCHAAD, N.W., JONES, J.B. & CHUN, W. *Plant Pathogenic Bacteria* (3th). St. Paul: APS. 2001.

TAVARES, L.A., MICHEREFF, S.J., SOUZA, R.M. & MARIANO, R.L.M. Análise de solo para detecção de risco de infecção de tomateiro por *Ralstonia solanacearum*. *Summa Phytopatologica* 26:311-316. 2000.

VAN DER WOLF, J.M., VRIEND, S.G.C., KASTELEIN, P., NIJHUIS, E.H., VAN BEKKUM, P.J. & VAN VUURDE, J.W.L. Immunofluorescence Colony-staining (IFC) for Detection and Quantification of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* Biovar 2 (Race 3) in Soil and Verification of Positive Results by PCR and Dilution Plating. *European Journal of Plant Pathology* 106:123-133. 2000.

APÊNDICE

Relação dos meios seletivos utilizados para detecção de *Ralstonia solanacearum* no solo, com a relação dos devidos componentes.

Selective Medium (SM) (Karganilla & Buddenhagen, 1972)	Final Selective Medium (FSM) (Nesmith & Jenkins Jr., 1979)
Manitol 2,5 g ¹ Ácido glutâmico 1 g MgSO ₄ .7H ₂ O 1,6 g Ágar 20 g ² Solução estoque dos metais 0,5 mL MnSO ₄ .H ₂ O 616 mg ZnSO ₄ .7H ₂ O 1,1 g FeSO ₄ (NH ₂) ₂ SO ₄ .6H ₂ O 176 mg CoSO ₄ .5H ₂ O 28 mg CuSO ₄ .5H ₂ O 28 mg H ₃ BO ₃ 11, 44 mg KI 0,0128 mg ³ Tetrazolium 50 mg Bacitracina 500 mg Cloranfenicol 5 mg Penicilina G 1 mg Tirotricina 20 mg Vancomicina 10 mg Cicloheximida 50 mg Captan 10 mg	K ₂ HPO ₄ 1,18 g KH ₂ PO ₄ 0,44 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,32 g MgSO ₄ .7H ₂ O 0,2 g MnSO ₄ .H ₂ O 1,5 mg ZnSO ₄ .7H ₂ O 1,6 mg FeC ₆ H ₅ O ₇ .5H ₂ O 3 mg Ácido cítrico 1,9 mg Glicose 4 g Peptona 10 g Extrato de levedura – 1 g Caseína 1g Ágar 20 Penicilina G 1 mg Tirotricina 20 mg Cloranfenicol 5 mg Tetrazolium 500 mg Sulfato de polimixina B 100 mg Vancomicina 10 mg Bacitracina 50 mg Benomyl 500 mg Cloroneb 100 mg Cicloheximida 50 mg Quintozene 30 mg Pimaricina 20 mg Dicloran 100 mg
Selective Medium 1 (SM-1) (Granada & Sequeira, 1983)	Potato Crystal violet Chloramphenicol Gellan gum (PCCG) (Hara <i>et al.</i> , 1995)
Peptona 10 g Glicose 5 g Caseína 1 g Ágar 15 g Tetrazolium 50 mg Sulfato de polimixina B 100 mg Tirotricina 20 mg Cloranfenicol 5 mg Cicloheximida 50 mg Clorotalonil 80 mg Timerosal 5 mg Cristal violeta 50 mg	Caldo de 300 g de batata 1L Peptona 5 g Glicose 15 g Ágar 15 g Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O 0,5 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O 2 g Cristal violeta 5mg Sulfato de polimixina B 4x10⁵ UI Cloranfenicol 7,5 mg Cicloheximida 50 mg Tetrazolium 25 mg

APÊNDICE – continuação.

South Africa Selective Medium - Esphinstone (SMSA-E)
(Elphinstone *et al.*, 1996)

Peptona 10 g
Glicerol 5 mL
Caseína 1 g
Ágar 15 g
Tetrazolium 50 mg
Cristal violeta 5 mg
Sulfato de polimixina B 100 mg
Bacitracina 25 mg
Penicilina 0,5 mg
Cloranfenicol 5 mg
Cicloheximida 100 mg

¹ Quantidade necessária para o preparo de 1 litro de meio.

² Os metais foram adicionados em 100 mL de água destilada.

³ Os agentes antimicrobianos, destacados em negrito, foram adicionados após a autoclavagem da base dos meios.

CAPÍTULO 2

ÓLEO ESSENCIAL DE MOSTARDA NO CONTROLE DA MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

RESUMO

Buscou-se avaliar o efeito dos vapores do óleo essencial de mostarda (EOM) sobre *Ralstonia solanacearum*, bem como a sua utilização no tratamento do solo para o controle da murcha bacteriana do tomateiro. Utilizou-se o EOM sintético, com 90% de isotiocianato de alila (ITCA), sendo as doses ajustadas em função da concentração de ITCA. Os vapores do EOM inibiram completamente o surgimento de colônias de *R. solanacearum* após 24 horas de exposição, na concentração de 10 μ L de ITCA/L de espaço. Este mesmo tratamento proporcionou a diminuição no crescimento de colônias já formadas e o aumento do extravasamento de metabólitos intracelulares em células de *R. solanacearum*. Bactérias gram-positivas e anaeróbicas facultativas foram menos sensíveis ao produto que *R. solanacearum*. A fumigação com o EOM por sete dias do solo infestado (10⁷ ufc/g) proporcionou a diminuição da população do patógeno no solo e a redução da incidência de murcha bacteriana na medida em que se aumentavam as concentrações de ITCA. Nas maiores concentrações utilizadas, o EOM foi capaz de zerar a recuperação da bactéria do solo e controlar em 100% a incidência da doença nas plantas de tomate após 48 dias de avaliação.

ESSENTIAL OIL OF MUSTARD TO CONTROL TOMATO BACTERIAL WILT

ABSTRACT

Evaluation of the effect of the essential oil of mustard (EOM) gaseous on *Ralstonia solanacearum* and its use for soil treatment to control tomato bacterial wilt. Synthetic EOM was used, with 90% of isothiocyanate (ITCA), and the doses were adjusted in function of the ITCA concentration. The EOM gaseous inhibited the appearance of colonies of *R. solanacearum* completely after 24 hours of exposition, in the concentration of 10 μ L of ITCA/L per space. This treatment reduced the colonies growth already formed and increased the linkage of intracellular metabolites of *R. solanacearum*. Gram-positive and anaerobic bacteria were less sensitive to the product than *R. solanacearum*. The fumigation with EOM for seven days of the infested soil (10⁷ ufc/g) decreased the population of the pathogen in the soil and reduced the incidence of the tomato bacterial wilt, when ITCA concentration was increased. In high concentrations, EOM was capable to reduce to zero the recovery of the bacterium of the soil and control 100% the incidence of the disease in the tomato plants during 48 days of evaluation.

1. INTRODUÇÃO

O tomate é uma das culturas mais importantes do mundo, amplamente disseminada pela Europa, Américas, Oriente Médio e Índia, além de se encontrar em plena expansão na China, Japão e Sudeste Asiático (López-Ráez *et al.*, 2008). Um fator limitante para sua produção nas regiões mais quentes do mundo é a ocorrência da murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* 1996. O controle da doença é difícil devido principalmente à ampla gama de hospedeiros, alta variabilidade genética, capacidade de sobrevivência do patógeno por longos períodos, localização protegida na planta e dificuldade na obtenção de variedades resistentes (Buddenhagen & Kelman, 1964; Hayward, 1991).

O brometo de metila foi utilizado durante muitos anos com grande eficácia na esterilização de substratos e, em certos casos, para a desinfestação de campos de produção de tomate, principalmente no cultivo de tomate em ambiente protegido (Duniway, 2002). Entretanto, o uso deste produto tem sido gradativamente restringido em todo o mundo, seguindo as recomendações do Protocolo de Montreal, em decorrência dos danos que ocasiona ao meio ambiente, principalmente em relação ao efeito deletério sobre a camada de ozônio (Messiha *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2006). Sendo assim, é necessário buscar alternativas viáveis e eficientes para substituir este produto no tratamento de solo.

A incorporação de matéria orgânica ao solo para a supressão da população de *R. solanacearum* é uma alternativa, sendo que, em diversos trabalhos, a utilização de tecidos de brássicas foi eficiente no controle da doença, fato este atribuído à ação antimicrobiana dos produtos da degradação de seus componentes, como os glucosinolatos (Arthy *et al.*, 2005; Kirkegaard *et al.*, 1998; Olivier *et al.*, 2006; Sharma & Kumar, 2004). Estas substâncias são encontradas em diversas espécies de brássicas, como por exemplo, couve de Bruxelas, brócolis, couve-flor, repolho, agrião, mostarda, entre outras (Song *et al.*, 2005). Entretanto, estes compostos possuem limitada atividade biológica, até serem hidrolisados pela enzima mirosinase, sendo que os produtos originados desta reação apresentam-se tóxicos e antinutricionais a certos organismos (Borek *et al.*, 1995).

Os glucosinolatos e a enzima mirosinase encontram-se em compartimentos separados dentro dos tecidos intactos da planta. Quando a compartimentalização é perdida devido a danos físicos ocorridos nos tecidos, na presença de água, ocorre a

hidrólise dos glucosinolatos, catalisada pela enzima mirosinase (Song *et al.*, 2005). Os isotiocianatos são um dos grupos de substâncias produzidas em maior quantidade por esta reação e estão relacionados aos efeitos nematicida, fungicida, bactericida, inseticida e herbicida. Alguns destes têm papel importante na resistência de plantas a bactérias fitopatogênicas, como o 4-metilsulfinilbutil isotiocianato (Tierens *et al.*, 2001). Em alguns trabalhos, a utilização de 2-feniletil-isotiocianato e benzil-isotiocianato proporcionou a inibição do desenvolvimento de *R. solanacearum in vitro* (Olivier *et al.*, 2006; Smith & Kirkegaard, 2002).

O mais abundante isotiocianato produzido pela degradação dos tecidos de brássicas é o isotiocianato de alila (Borek *et al.*, 1995; Harvey *et al.*, 2002), o qual também é considerado o de maior potencial antimicrobiano (Lin *et al.*, 2000b; Shofran *et al.*, 1998). Ele é encontrado em altas concentrações nas sementes de mostarda (*Brassica* spp.), sendo também denominado óleo essencial de mostarda (EOM), e pode ser extraído destas ou produzido sinteticamente (Dhingra *et al.*, 2004a; Dhingra *et al.*, 2004b). O isotiocianato de alila (ITCA) se apresenta como um produto promissor no controle de patógenos de solo, com efeito significativo na supressão de fungos (Dhingra *et al.*, 2004a; Harvey *et al.*, 2002; Singh & Singh, 1970) e nematóides (Chitwood, 2002; Kokalis-Burelle & Rodríguez-Kábana, 2006; Zasada & Ferris, 2003; Zasada & Ferris, 2004). Delaquis & Sholberg (1997) observaram o efeito *in vitro* dos vapores do ITCA sobre *Pseudomonas corrugata*, bactéria causadora da necrose da medula do tomateiro, sendo que ao final de seus estudos obtiveram inibição do desenvolvimento da bactéria a partir da dose de 500 mg/L. Porém, a maioria dos relatos do efeito antibacteriano do ITCA são encontrados em trabalhos com bactérias patogênicas a humanos e contaminantes de alimentos (Lin *et al.*, 2000a; Lin *et al.*, 2000b; Shin *et al.*, 2004). Tendo em vista o grande potencial do EOM no controle de patógenos de solo e a sua comprovada atividade antibacteriana, faz-se necessário e conveniente avaliar o seu efeito sobre *R. solanacearum*, bem como a possibilidade de sua utilização como alternativa no tratamento do solo para o controle da murcha bacteriana. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação dos vapores do EOM sobre *R. solanacearum in vitro* e no solo, visando ao controle da murcha bacteriana do tomateiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos Gerais.

2.1.1. Obtenção, padronização e preservação dos isolados de *Ralstonia solanacearum*.

Foram utilizados seis isolados de *R. solanacearum*, dos biovares 1, 2 e 3, originados de diferentes localidades do Brasil (Tabela 1). Os isolados foram inoculados em plantas de tomateiro (cv. Santa Clara) pelo método de imersão das raízes em suspensão bacteriana (Schaad *et al.*, 2001) a fim de averiguar a patogenicidade e identificar o isolado mais agressivo. Evidenciados os sintomas, procedeu-se o reisolamento da bactéria e a preservação dos isolados em tubos contendo água estéril e por criopreservação em glicerina 40% à -80°C.

Tabela 1 – Isolados de *Ralstonia solanacearum* avaliados quanto a sensibilidade aos vapores do óleo essencial de mostarda *in vitro*.

Código	Origem	Hospedeiro	Biovar
1	Ervália – MG	Tomate	1
2	Coimbra – MG	Tomate	1
3	Cruz das Almas – BA	Tomate	2
4	Cruz das Almas – BA	Berinjela	2
5	Rio de Janeiro – RJ	Tomate	3
6	Brasília – DF	Tomate	1

2.1.2. Calibração da concentração de inóculo.

Para o preparo do inóculo de *R. solanacearum*, os isolados foram semeados em meio CPG (Casamino acid Peptone Glucose) (Kelman, 1954) sólido e incubados a 28±1°C. Após 48 horas, as células bacterianas foram suspensas em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) e a turbidez da suspensão ajustada em espectrofotômetro Spectronic 20® para O.D.₆₀₀ = 0,01, o que equivale aproximadamente 1 x 10⁸ ufc (unidades formadoras de colônias)/mL (Schaad *et al.*, 2001). Esta suspensão inicial foi diluída dependendo da concentração desejada nos experimentos realizados.

2.1.3. Óleo Essencial de Mostarda.

Utilizou-se óleo essencial de mostarda sintético (90% de ITCA), usado como flavorizante na indústria alimentícia, o qual foi adquirido junto a Petite Marie Química Fina, Indústria e Comercio de Produtos Químicos Ltda. (São Paulo, SP, Brasil). As doses do EOM utilizadas nos experimentos foram calibradas em função da concentração de ITCA. Nos experimentos em que a concentração de ITCA foi menor que 10µL/L de espaço, o EOM foi diluído em óleo de soja a uma concentração de 12% de ITCA.

2.1.4. Substrato utilizado.

Nos experimentos, utilizou-se um solo de classe textural argilo-arenosa, contendo 52% de areia, 3% de silte e 44% de argila. A densidade do solo era de 1,04 kg/dm³ e o pH em água de 5,8. O solo continha ainda 3,55% de matéria orgânica, 8,5 mg/dm³ de fósforo, 1350 mg/dm³ de potássio e 2,91 cmol_c/dm³ de cálcio. O solo foi tratado com brometo de metila três meses antes de ser utilizado. Após infestação com a suspensão bacteriana, o solo apresentava teor de umidade variando entre 17 e 18% (peso/peso).

2.1.5. Plantas de tomate.

Sementes de tomate cultivar Santa Clara foram semeadas em bandejas de polietileno expandido, com 128 células, contendo o substrato. Estas foram cultivadas em casa de vegetação (temperatura máxima de 30°C) e utilizadas entre 15 e 20 dias da semeadura, quando as plantas apresentavam de duas a três folhas verdadeiras. Foi feita adubação foliar com Ouro Verde® aos 15 dias de cultivo.

2.2. Mortalidade *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* pelos vapores do óleo essencial de mostarda.

Foram vertidos 10mL de meio TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) (Kelman, 1954) em placas de Petri de 90mm de diâmetro e 15mm de altura. Estas foram subdivididas externamente em seis secções, sendo semeados 5µL de um

isolado distinto da bactéria, na concentração de 1×10^3 ufc/mL, em cada uma das secções. Em câmara de fluxo laminar, as tampas das placas foram retiradas e as placas distribuídas de quatro em quatro para caixas acrílicas do tipo gerbox (2,4L). Após acondicionar as placas, em cada caixa colocou-se um tubo do tipo penicilina sem tampa contendo EOM, com concentrações de ITCA variando entre zero (controle) e $150\mu\text{L/L}$ de volume. As caixas foram lacradas com filme de PVC e mantidas a $28\pm 1^\circ\text{C}$ por períodos de exposição de 24 e 48 horas. Após estes períodos, as placas foram retiradas das caixas e deixadas abertas em câmara de fluxo laminar por cinco minutos para eliminação dos vapores do produto. Em seguida, estas foram fechadas com as respectivas tampas e novamente mantidas a $28\pm 1^\circ\text{C}$. Avaliou-se a presença ou não de crescimento bacteriano e o número de colônias em cada setor após 72 horas da interrupção da exposição ao produto.

2.3. Efeito dos vapores do óleo essencial de mostarda sobre as colônias de *Ralstonia solanacearum*.

Em placas de Petri contendo o meio CPG foram adicionados $100\mu\text{L}$ de suspensão bacteriana na concentração de 1×10^3 ufc/mL, sendo o conteúdo da suspensão espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram mantidas à 28°C e, após 48 horas, em cada placa foram marcadas externamente cinco colônias isoladas escolhidas ao acaso, procedendo-se a medição do diâmetro destas. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar foram retiradas as tampas das placas e estas foram transferidas para caixas acrílicas do tipo gerbox (2,4L) juntamente com um tubo do tipo penicilina sem tampa contendo EOM, com as concentrações de ITCA variando de zero (controle) até a concentração mínima inibitória determinada no experimento 2.2. As caixas foram lacradas com filme de PVC e mantidas a $28\pm 1^\circ\text{C}$. Após 24 horas de exposição, as placas foram retiradas das caixas e deixadas abertas em câmara de fluxo laminar por cinco minutos, para eliminação dos vapores do produto. Novamente, foi feita a medição do diâmetro das colônias selecionadas para avaliar o seu crescimento. Em seguida, as células bacterianas foram colhidas adicionando-se 5mL de solução salina (0,85% de NaCl) e movimentando-se as placas suavemente por 30 segundos. Este procedimento foi realizado duas vezes para cada placa. A suspensão obtida de cada placa foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 rpm (Centrífuga Sorvall RC5B, rotor SM-34) e o sobrenadante foi utilizado

para a determinação da absorbância no comprimento de onda de 280 nm (A_{280}). Diferenças nos valores de absorbância entre os tratamentos e o controle foram utilizadas para estimar a perda de metabólitos intracelulares pelas células bacterianas, conforme descrito em Lin *et al.* (2000b), onde o aumento no valor de A_{280} corresponde à uma maior perda de metabólitos intracelulares. Foi realizada uma análise de correlação de Pearson entre os valores médios de A_{280} e as concentrações de ITCA correspondentes, para verificar o grau de correlação entre estas variáveis.

2.4. Sensibilidade de diferentes espécies bacterianas aos vapores do óleo essencial de mostarda.

Foram preparadas suspensões bacterianas de *Bacillus cereus* (gram-positiva, anaeróbica facultativa), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (gram-positiva, aeróbica estrita), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (gram-negativa, anaeróbica facultativa) e *R. solanacearum* (gram-negativa, aeróbica estrita) a partir de culturas cultivadas em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) a 28°C por 48 horas. A suspensão foi calibrada para $OD_{540} = 0,01$ e diluída na proporção de 1:10, até 10^{-4} . Placas de Petri contendo meio 523 foram subdivididas externamente em quatro secções, sendo em cada uma destas, semeados 10 μ L de suspensão de cada bactéria. Em câmara de fluxo laminar, as tampas das placas foram retiradas e as placas distribuídas de quatro em quatro para caixas acrílicas do tipo gerbox (2,4L). Em seguida, colocou-se um tubo do tipo penicilina sem tampa contendo EOM, com as concentrações de ITCA variando de zero (controle) até a concentração mínima inibitória, determinada no experimento 2.2. As caixas foram lacradas com filme de PVC e mantidas a 28 ± 1 °C por períodos de exposição de 24, 48 e 72 horas. Ao final de cada período, as placas foram retiradas das caixas, deixadas abertas em câmara de fluxo laminar por cinco minutos para eliminação dos vapores do produto, fechadas com as respectivas tampas e novamente mantidas a 28 ± 1 °C. Cada tratamento foi avaliado quanto à presença ou não de crescimento bacteriano até 72 horas após a interrupção da exposição ao produto.

2.5. Efeito do óleo essencial de mostarda sobre a população de *Ralstonia solanacearum* no solo.

O solo foi infestado com suspensão bacteriana (isolado mais agressivo) na concentração de 1×10^8 ufc/mL, na proporção 1:9 (v/v). Após a infestação, o solo foi acondicionado em erlenmeyers de 250mL e mantidos a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 24 horas, foi adicionado em cada erlenmeyer alíquotas de EOM, de modo a se obter as concentrações de zero (controle), 10, 25, 50, 75 e 100 μL de ITCA por litro de solo. Os erlenmeyers foram lacrados com filme de PVC e mantidos a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Após sete dias, os recipientes foram abertos, o solo vertido para um Becker de 1L, homogeneizado e retirada uma amostra de 10g. Cada amostra foi suspensa em 100mL de solução salina esterilizada, acrescida de 0,5% de Tween 80 e a suspensão foi agitada a 150 rpm por 30 minutos. Em seguida, a suspensão foi diluída em série de 10^{-1} a 10^{-5} , também em solução salina esterilizada contendo Tween 80. Uma alíquota de 100 μL de cada diluição foi depositada em placas de Petri contendo o meio semi-seletivo SMSA-E (Elphinstone *et al.*, 1996), acrescido de vancomicina (10mg/L). A alíquota foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky e, em seguida, as placas foram mantidas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 72 horas, procedeu-se a contagem do número de colônias no meio seletivo para estimar a população de *R. solanacearum* no solo. Por meio de análise de regressão, estimou-se a concentração efetiva necessária para reprimir 100% da população de *R. solanacearum* no solo (EC_{100}).

2.6. Efeito do óleo essencial de mostarda no controle da murcha bacteriana do tomateiro.

Em sacos plásticos (40x60cm; 0,18mm), foram adicionados 4,5L de solo e 0,5L de suspensão bacteriana (isolado mais agressivo), na concentração de 1×10^8 ufc/mL. A mistura foi homogeneizada e mantida em câmara de crescimento a 26°C . Após 24 horas, adicionou-se uma alíquota de EOM, em concentrações equivalentes a zero (controle), 0,5, 1, 1,5 e 2 vezes a EC_{100} , estimada no experimento 2.5. Os sacos foram fechados e mantidos a 26°C . Após sete dias o solo foi distribuído em 10 vasos de 500mL e em cada um deles foi transplantada uma muda de tomate. As plantas foram levadas para câmara de crescimento a 26°C . Após 45

dias do transplante das mudas, avaliou-se a porcentagem final de incidência de murcha bacteriana e o progresso da doença em cada tratamento durante este período.

2.7. Local de realização da pesquisa e análises estatísticas.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia e Patologia de Sementes, na Clínica de Doenças de Plantas, em casa de vegetação e em câmara de crescimento de 26°C do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa entre janeiro e dezembro de 2008. Os ensaios foram montados em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento, exceto no item 2.6, onde se utilizou blocos ao acaso com quatro repetições. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando-se os procedimentos PROC CORR, PROC GLM e PROC NLIN do programa estatístico SAS 9.1 (Statistical Analysis System, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Os parâmetros (P) mortalidade, inibição do crescimento de colônias e repressão da população no solo foram demonstrados em porcentagem, sendo obtidos a partir da seguinte equação: $P(\%) = [(N-n)/N] \times 100$, em que N = valor médio observado no tratamento controle e n = valor obtido nos tratamentos com o EOM. Em alguns experimentos, foi realizada a análise de regressão com base nas médias dos tratamentos. O ajuste dos modelos foi baseado no coeficiente de determinação, quadrado médio do erro, significância dos parâmetros, normalidade na distribuição dos erros e distribuição não tendenciosa no gráfico de resíduos. Cada experimento foi executado duas vezes, visando verificar a repetibilidade dos resultados obtidos.

3. RESULTADOS

3.1. Mortalidade *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* pelos vapores do óleo essencial de mostarda.

No primeiro experimento, onde se avaliou as concentrações de zero, 10, 25, 50, 75 e 100 µL de ITCA/L de espaço, os vapores do EOM foram capazes de inibir completamente o aparecimento de colônias de *R. solanacearum* na menor concentração utilizada (10µL de ITCA/L de espaço) com apenas 24 horas de exposição. Esta combinação foi eficiente em inibir completamente o

desenvolvimento de todos os isolados avaliados. No segundo experimento, utilizando apenas o isolado 1 (mais agressivo), avaliou-se a exposição por 24 horas utilizando as concentrações de zero, 2, 4, 6 e 10 μL de ITCA/L de espaço. Apenas a concentração de 10 μL de ITCA/L de espaço foi capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, sendo esta a concentração mínima inibitória *in vitro* de ITCA à *R. solanacearum* com 24 horas de exposição. Na análise de regressão, o modelo descontínuo LRP (Linear Response Plateau) foi o que melhor se ajustou aos dados, com todos os parâmetros significativos (t, $P < 0,01$). Com base neste modelo foi possível estimar em 2,74 μL de ITCA/L de espaço a concentração a partir da qual o valor percentual da mortalidade *in vitro* permaneceu em um platô correspondente à 99,85% de mortalidade (Figura 1).

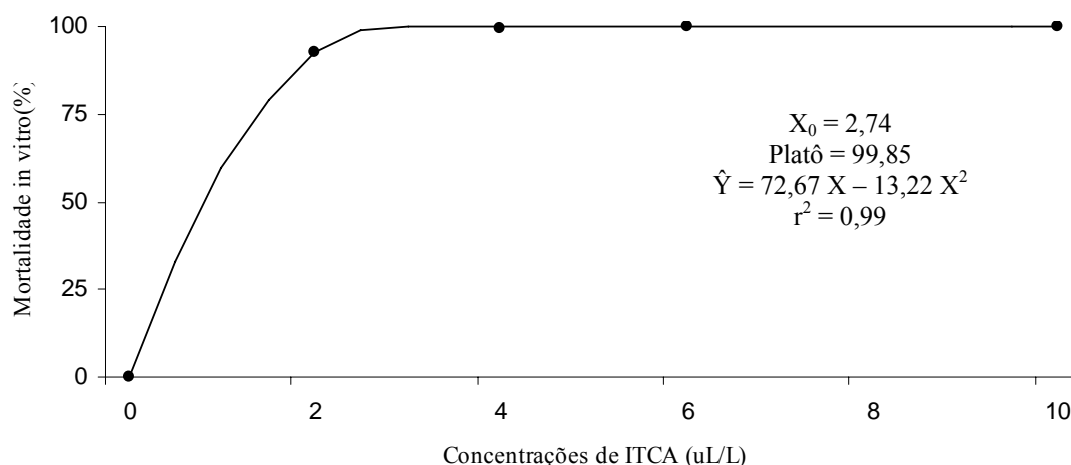


Figura 1 – Efeito dos vapores do óleo essencial de mostarda, em diferentes concentrações de ITCA (isotiocianato de alila), na mortalidade *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*, após 24 horas de exposição. A linha contínua representa os valores estimados pelo modelo e os pontos representam a média dos valores observados.

3.2. Efeito dos vapores do óleo essencial de mostarda sobre as colônias de *Ralstonia solanacearum*.

O desenvolvimento das colônias de *R. solanacearum* foi bastante afetado após a exposição destas aos vapores do EOM por 24 horas. Pode-se observar uma drástica redução no crescimento das colônias logo nas menores concentrações avaliadas. Entretanto, nenhuma das concentrações avaliadas apresentou 100% de inibição do crescimento, sendo que, na maior concentração avaliada (10 μL de

ITCA/L) observou-se um valor médio de 96,15% de inibição no aumento do diâmetro das colônias. Na análise de regressão, utilizou-se o modelo descontínuo LRP, o qual apresentou o melhor ajuste com todos os parâmetros significativos (t , $P < 0,01$), para estimar o percentual de inibição no crescimento das colônias em função das concentrações de ITCA. Desta forma, estimou-se em 2,84 μL de ITCA/L a concentração a partir da qual a inibição do crescimento das colônias atinge um platô, cujo valor estimado é de 95,61% (Figura 2). Quanto ao extravasamento de metabólitos intracelulares, observaram-se perdas crescentes de conteúdo intracelular à medida que as concentrações dos vapores de EOM aumentavam. Após a análise de correlação de Pearson entre os valores de A_{280} e as concentrações de ITCA correspondentes, obteve-se o valor de 0,89 para o coeficiente de correlação de Pearson (r), indicando haver uma correlação forte e positiva entre as duas variáveis. (Figura 3).

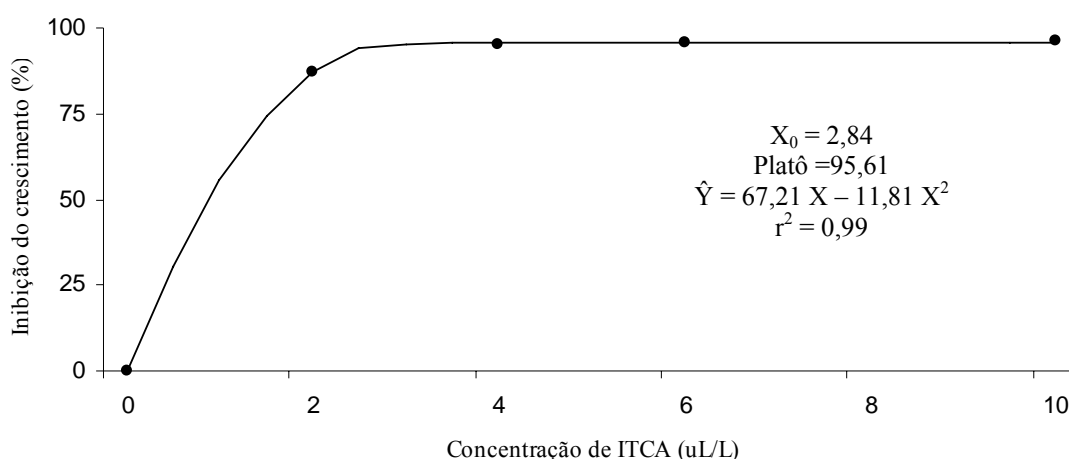


Figura 2 – Efeito dos vapores do óleo essencial de mostarda na inibição do crescimento de colônias de *Ralstonia solanacearum* (48 horas de idade) após exposição por 24 horas à diferentes concentrações de isotiocianato de alila (ITCA). A linha contínua representa os valores estimados pelo modelo e os pontos representam a média dos valores observados.

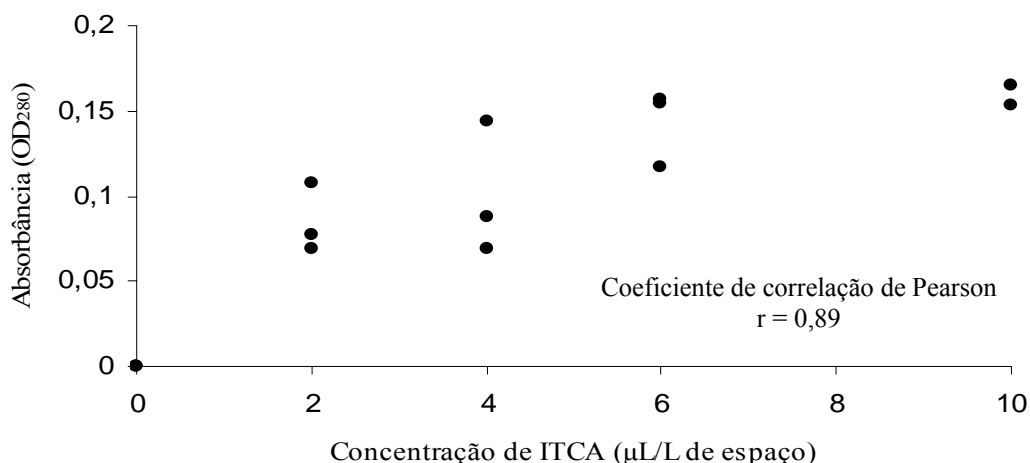


Figura 3 – Efeito dos vapores do óleo essencial de mostarda sobre o extravasamento de metabólitos intracelulares estimados pelo aumento na absorbância a 280nm (A_{280}). Os pontos correspondem às diferenças entre os valores de A_{280} expressos nos tratamentos e o valor médio obtido no tratamento controle. O valor de r foi obtido pela correlação entre aos valores de A_{280} observados e as concentrações de isotiocianato de alila (ITCA) correspondentes.

3.3. Sensibilidade de diferentes espécies bacterianas aos vapores do óleo essencial de mostarda.

Observou-se a presença de crescimento bacteriano em todos os tratamentos com *B. cereus*, apesar da visível diminuição no número de colônias à medida que se aumentava a concentração de ITCA e o tempo de exposição (Tabela 2). Nos tratamento com *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, observou-se a mesma tendência, sendo que no tratamento onde as culturas foram expostas por 72 horas à 10μL de ITCA/L de espaço, em algumas repetições não se observou o surgimento de colônias. O desenvolvimento de colônias de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foi completamente inibido quando as culturas foram expostas à 10μL de ITCA/L de espaço por 72 horas. O maior nível de sensibilidade aos vapores do EOM foi observado em *R. solanacearum*, a qual teve seu desenvolvimento suprimido quando exposta à 8μL de ITCA/L de espaço com 72 horas de exposição e em todos os tempos de exposição quando se utilizou a concentração de 10μL de ITCA/L de espaço.

Tabela 2 – Inibição no desenvolvimento de diferentes espécies de bactérias pelos vapores do óleo essencial de mostarda em diferentes concentrações de isotiocianato de alila (ITCA) e tempos de exposição ao produto.

Espécie bacteriana	ITCA Concentração (µL/L)	Tempo de exposição		
		24 horas	48 horas	72 horas
<i>B. cereus</i> G+/An	2	+ ¹	+	+
	4	+	+	+
	6	+	+	+
	8	+	+	+
	10	+	+	+
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> G+/Ae	2	+	+	+
	4	+	+	+
	6	+	+	+
	8	+	+	+
	10	+	+	±
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> G-/An	2	+	+	+
	4	+	+	+
	6	+	+	+
	8	+	+	+
	10	+	± ³	-
<i>R. solanacearum</i> G-/Ae	2	+	+	+
	4	+	+	+
	6	+	+	+
	8	+	±	-
	10	- ²	-	-

¹Presença de crescimento bacteriano em todas as repetições. ²Ausência de crescimento bacteriano em todas as repetições. ³Ausência de crescimento bacteriano em alguma repetição. G+ (gram-positiva), G- (gram-negativa), An (anaeróbica facultativa), Ae (aeróbica estrita).

3.4. Efeito do óleo essencial de mostarda sobre a população de *Ralstonia solanacearum* no solo.

No primeiro experimento, todas as concentrações avaliadas proporcionaram médias de repressão a população de *R. solanacearum* no solo superiores a 50%. Na análise de regressão realizada, o melhor ajuste foi conseguido com o modelo raiz quadrada, com todos os parâmetros significativos (t, P<0,01). Por meio da equação gerada pela análise de regressão (Figura 4A), a EC₁₀₀ estimada foi de 100,6µL de ITCA/L de solo. No segundo experimento, os valores obtidos para o índice de

inibição de *R. solanacearum* seguiram a tendência apresentada no primeiro experimento (Figura 4B). Procedeu-se a análise de regressão utilizando o modelo raiz quadrada, o qual se ajustou melhor aos dados, com todos os parâmetros significativos (t, $P < 0,01$). Por meio da equação gerada, estimou-se em 103,26 μL de ITCA/L o valor da EC_{100} . A média dos valores estimados de EC_{100} foi de 101,93. Muito próxima do valor observado (100 μL de ITCA/L de solo). Sendo assim, este último foi utilizado como EC_{100} nos demais experimentos.

3.5. Efeito do óleo essencial de mostarda no controle da murcha bacteriana do tomateiro

Com base nos resultados observados no experimento 3.4, o solo foi tratado com EOM, nas concentrações de ITCA de zero (controle), 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{L/L}$ de solo. As primeiras plantas murchas foram observadas a partir do 8º dia após o transplântio das mudas. Com 48 dias de avaliação, apenas nos tratamentos de 0 e 50 $\mu\text{L/L}$, foi possível observar plantas com incidência da doença (Figura 5). Ainda assim, a dose de 50 $\mu\text{L/L}$ foi capaz de atrasar em 11 dias o início da epidemia em relação ao tratamento controle. Nestes tratamentos, a média de incidência de murcha bacteriana foi de 88 e 60%, respectivamente. As doses a partir de 100 $\mu\text{L/L}$ possibilitaram 100% de controle da doença (Figura 6). Não se observou sintomas de fitotoxidez nas plantas cultivadas em solo tratado com o EOM em qualquer das dosagens avaliadas, também não se observou diminuição significativa no desenvolvimento das plantas, quando comparadas com plantas saudas, cultivadas em solo não tratado e sem a presença da bactéria.

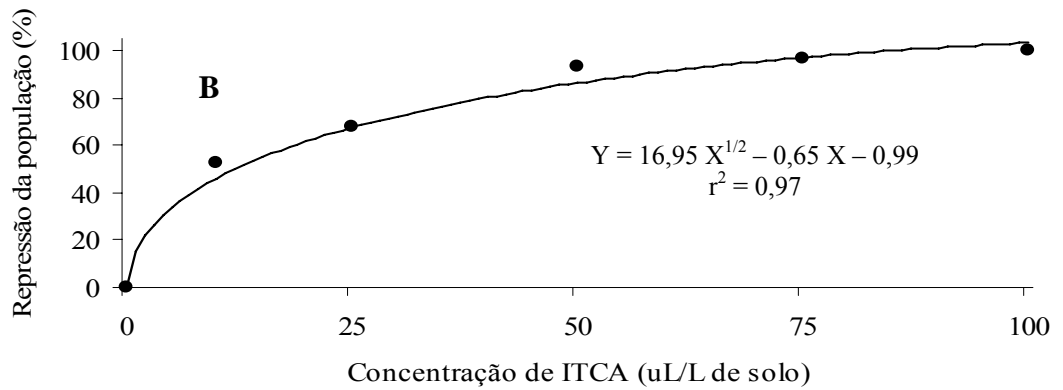
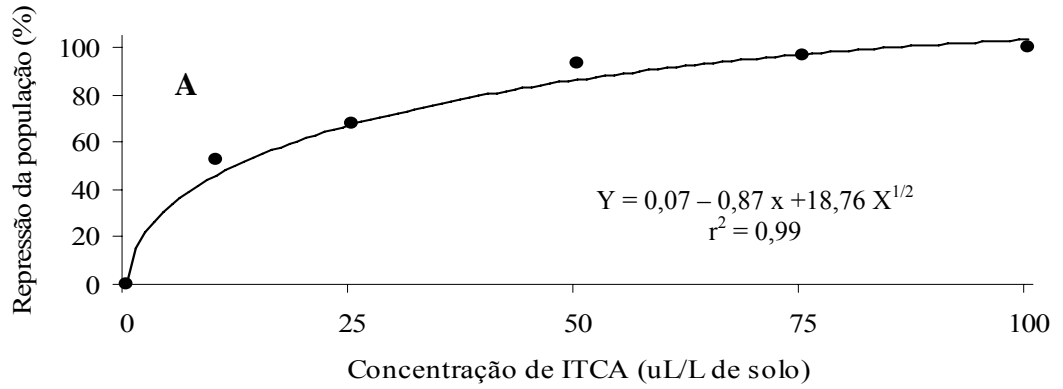


Figura 4 – Efeito dos vapores do óleo essencial de mostarda sobre a inibição da recuperação de *Ralstonia solanacearum* do solo pelo meio SMSA-E após sete dias de exposição ao produto. Os pontos representam os valores observados e a linha contínua os valores estimados pela equação obtida na análise de regressão. As figuras A e B correspondem à primeira e segunda repetição deste experimento.

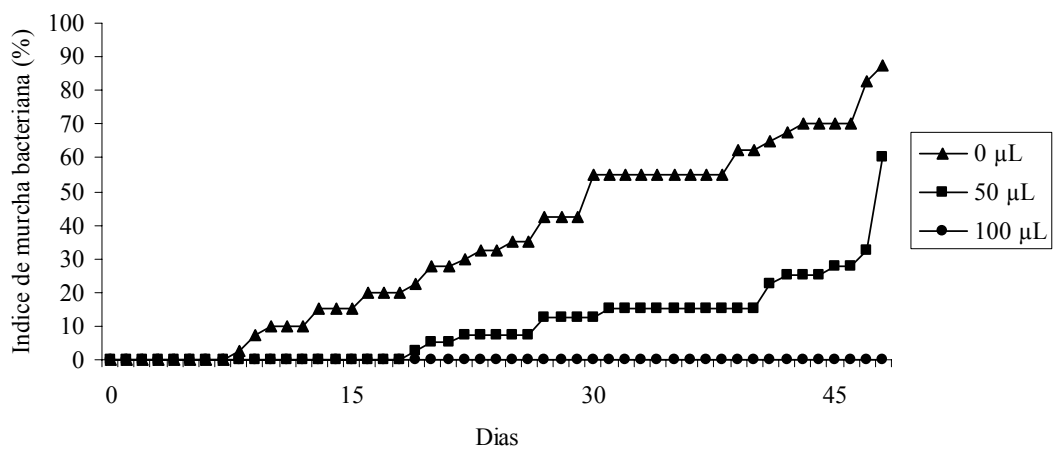


Figura 5 – Avaliação do progresso da murcha bacteriana nas plantas de tomate durante o período de avaliação para os tratamentos com 0, 50 e 100µL de isotiocianato de alila (ITCA)/L de solo.

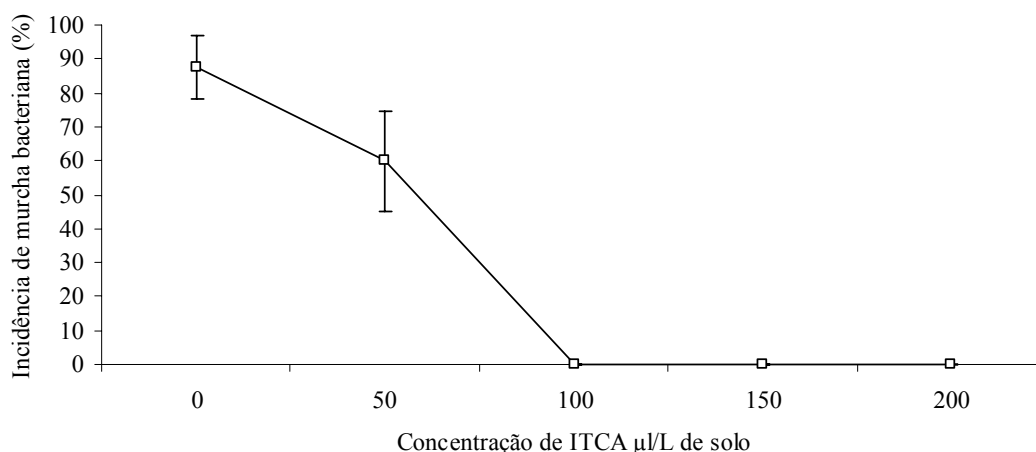


Figura 6 – Efeito da fumigação do solo com o óleo essencial de mostarda, em diferentes concentrações de isotiocianato de alila (ITCA), sobre a incidência final da murcha bacteriana em tomateiro. Linhas verticais correspondem ao erro padrão da média.

4. DISCUSSÃO

Os vapores de EOM foram altamente tóxicos *in vitro* a *R. solanacearum*, comprovando o efeito bactericida já observado por outros autores em outras espécies bacterianas (Delaquis & Sholberg, 1997; Lin *et al.*, 2000b; Shofran *et al.*, 1998). Após 24 horas de exposição, todos os isolados avaliados apresentaram como concentração mínima inibitória o valor de 10µL de ITCA/L de espaço, apontando para a não existência de variabilidade entre estes quanto à sensibilidade ao produto. O ITCA demonstrou maior inibição *in vitro* à *R. Solanacearum* do que outros isotiocianatos avaliados para este fim (Olivier *et al.*, 2006; Smith & Kirkegaard, 2002). A maior toxicidade do ITCA em relação a outros subprodutos da degradação dos glucosinolatos também foi observada para outras espécies bacterianas (Shofran *et al.*, 1998) e para leveduras (Kojima e Ogawa, 1971, citados por Lin *et al.*, 2000b). A toxicidade a *R. solanacearum* foi observada tanto no início da multiplicação da bactéria, onde o produto inibiu o surgimento de colônias (Figura 1), como em estágios de desenvolvimento mais avançados, onde a exposição das colônias aos vapores de EOM interferiu no aumento do seu diâmetro (Figura 2). Isto leva a crer que a ação do ITCA sobre *R. solanacearum* possa ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento da bactéria, o que já foi comprovado para *E. coli* (Lin *et al.*, 2000b). Entretanto, ao compararmos os valores máximos de inibição estimados

(Platô), podemos observar que culturas de *R. solanacearum* em estágios mais avançados são menos sensíveis ao EOM. Esta menor sensibilidade pode ser explicada pela maior concentração da camada de exopolissacarídeo, o qual confere proteção às células bacterianas contra agentes químicos (Cox *et al.*, 1998).

O aumento no extravasamento de metabólitos celulares foi proporcional ao aumento da concentração dos vapores de EOM, demonstrando a interferência do produto na permeabilidade de membranas. Kawakishi & Kaneko (1987) observaram que o ITCA tem grande afinidade pela extremidade amino-terminal presente em cadeias polipeptídicas. Em decorrência, ele induz a clivagem de suas pontes de dissulfeto (S-S), responsáveis pela estabilidade de proteínas e enzimas, levando à diminuição da atividade destas. Sabendo-se que a membrana celular possui diversas proteínas, as quais tem papel de regulação do transporte de macromoléculas entre o interior da célula e o meio externo (Moat *et al.*, 2002), a ação do ITCA sobre estas proteínas levariam a uma distúrbio da integridade da membrana, o que ocasionaria a perda de metabólitos intracelulares, conforme observado em nosso trabalho. Lin *et al.* (2000b) também observaram o aumento dos valores de A_{280} e da concentração de β -galactosidase (uma enzima intracelular) no meio, quando culturas de *E. coli* foram expostas a vapores de ITCA. Estes autores acreditam que o efeito sobre a permeabilidade de membranas seja o principal responsável pela ação bactericida do produto. Burt (2004) também refere-se à degradação dos componentes da membrana celular e, conseqüentemente, perda da permeabilidade seletiva, como o principal efeito antibacteriano de óleos essenciais. Entretanto, a respiração celular bacteriana também é dependente da estabilidade estrutural da membrana celular (Cox *et al.*, 1998). Como a inativação de enzimas pela clivagem das pontes de dissulfeto ocorre de maneira não específica (Kawakishi & Kaneko, 1987), a ação do ITCA sobre enzimas presentes na membrana celular e que atuam na cadeia de transporte de elétrons, principalmente a citocromo C oxidase, pode levar a interrupção da respiração aeróbica. Isto pode explicar o fato de que, tanto em nosso trabalho, como em outros estudos (Delaquis & Sholberg, 1997; Shofran *et al.*, 1998), as bactérias aeróbicas estritas foram mais sensíveis ao produto que as anaeróbicas facultativas. Kojima e Ogawa (1971) citados por Lin *et al.* (2000b), ao analisarem a concentração necessária para inibir em 50% o desenvolvimento de leveduras, observaram que o ITCA necessitou de uma concentração 100 e 50.000 menor que o apresentado por cianureto de potássio e antimicina, respectivamente, sendo estes conhecidos como

inibidores da respiração. Neste mesmo estudo, observou-se que a concentração mínima inibitória de ITCA foi 100 vezes menor que a concentração necessária para inibir significativamente a absorção de oxigênio. Somando-se isto ao fato de que bactérias anaeróbicas facultativas também são sensíveis ao ITCA, acredita-se que a inibição na respiração não seja a principal causa do efeito antimicrobiano desta substância.

Outro fator que pode determinar a toxicidade do ITCA às bactérias, é que a alta afinidade deste químico pela extremidade amino-terminal de polipeptídios pode ocasionar a inativação de algumas substâncias importantes para o metabolismo da célula bacteriana, como a glutatona. A glutatona é um tripeptídio presente tanto no citoplasma quanto na membrana de células procariotas e é essencial por ser seu principal antioxidante e possuir papel importante na detoxificação das rotas metabólicas de síntese de proteínas e geração de energia (Chesney *et al.*, 1996). No trabalho realizado por Kawakishi & Kaneko (1985), foi observada a clivagem da glutatona em sua forma oxidada pela ação eletrofilica do ITCA.

Pode-se sugerir que o efeito antimicrobiano do ITCA sobre bactérias se deve a sua ação na diminuição das atividades de proteínas essenciais para o crescimento e a sobrevivência destes microrganismos, tendo como principal consequência a inibição da respiração celular e a perda da permeabilidade seletiva da membrana, acreditando-se que esta última possa ter maior importância na toxicidade do produto. De qualquer forma, esta característica de ação em vários sítios é bastante desejável a qualquer produto utilizado como agente antimicrobiano, pois dificulta o aparecimento de populações resistentes.

Observou-se que as bactérias gram-positivas foram menos sensíveis ao produto em relação às gram-negativas. Isto foi observado também em outros estudos, onde os dois grupos de bactérias foram avaliados (Delaquis & Sholberg, 1997; Lin *et al.*, 2000a; Shofran *et al.*, 1998) e, segundo Lin *et al.* (2000b), deve-se à diferenças na composição da membrana e da parede celular de ambos os grupos. Sabendo-se que a parede celular de bactérias gram-negativas é mais permeável que as de gram-positivas (Moat *et al.*, 2002), é bastante provável que o produto possa agir com maior intensidade sobre a membrana celular do primeiro grupo, pela maior facilidade de contato com esta.

Apesar de sempre se desejar um produto que possa suprimir populações de diversos microrganismos patogênicos quando se pensa em tratamento de solo, o

efeito esterilizante de certos produtos não é interessante, pois o solo torna-se mais propenso a reinfestação, em função da eliminação de sua microbiota (Bonanomi *et al.*, 2008). Sendo assim, a ocorrência de diferentes graus de sensibilidade ao ITCA entre microrganismos é um aspecto positivo quanto à manutenção da microbiota “benéfica” do solo. A adição ao solo de farelo de sementes de canola (*Brassica napus*), cujo óleo tem efeito sobre a diminuição da incidência de murcha bacteriana (Kirkegaard *et al.*, 1998), possibilitou a manutenção e até o aumento de populações de microrganismos saprófitas, como actinomicetes e *Pseudomonas* spp. Os estudos de (Cohen *et al.*, 2005) também apontam para certo grau de tolerância de populações de actinomicetes aos produtos da degradação dos glucosinolatos. Os autores observaram, inclusive, um aumento destes organismos e de bactérias saprofitas no solo, também com o acréscimo de farelo de sementes de canola. Desta forma, microrganismos que possam ser mais tolerantes a determinados tratamentos em relação a *R. solanacearum* podem multiplicar-se rapidamente e tornar o solo supressivo à bactéria (Lemessa & Zeller, 2007).

A dose mínima necessária para que a bactéria *R. solanacearum* não fosse recuperada do solo foi 10 vezes maior que a necessária para inibir completamente o desenvolvimento *in vitro*, sendo estas de 100 e 10 μ L/L de volume, respectivamente. Fenômeno semelhante foi observado por Dhingra *et al.* (2004a), ao avaliarem a concentração mínima inibitória de ITCA para *Rhizoctonia solani*, onde a concentração necessária para que não se pudesse detectar o fungo no solo correspondeu ao triplo da concentração mínima inibitória *in vitro*. A necessidade de doses maiores no solo pode ser resultado da maior degradação do produto neste substrato, a qual pode variar em função da umidade, pH, temperatura, microbiota entre outros fatores (Borek *et al.*, 1995; Kawakishi & Kaneko, 1987). Deste modo, a análise *in vitro* serve apenas para determinar a toxicidade do produto e estudos sobre o efeito deste na supressão da população do patógeno no solo são necessários.

O tempo de exposição aos vapores de ITCA é determinante para o efeito bactericida do produto, pois células bacterianas expostas por períodos de tempo pequenos são capazes de recuperar sua viabilidade (Delaquis & Sholberg, 1997; Lin *et al.*, 2000b). O tratamento do solo com ITCA por um período de sete dias com a dose de 100 μ L/L de solo foi capaz de suprimir a população de *R. solanacearum*, a ponto da bactéria não ser mais detectada pelo meio seletivo utilizado. Shofran *et al.* (1998) observaram que a concentração mínima inibitória de ITCA para várias

espécies bacterianas não muda quando estas são expostas durante períodos superiores a 96 horas. Outro aspecto interessante é que a meia vida do produto no solo é de aproximadamente 48 horas (Borek *et al.*, 1995). Sendo assim, a fumigação do solo por períodos maiores que 7 dias (168 horas) poderia não ser traduzida numa maior supressão de *R. solanacearum*, além de que a quantidade residual de ITCA no solo, passados os 7 dias da sua aplicação, seria muito baixa. Desta forma, não se justifica a adoção de períodos maiores de tratamento.

A supressão da população de *R. solanacearum* no solo tratado com EOM foi maior em comparação aos resultados observados por Olivier *et al.* (2006), quando estes utilizaram o benzil e o 2-fenil-isotiocianato no tratamento de solo infestado. Enquanto que, na máxima concentração utilizada no referido trabalho (2µM/g de solo), estes produtos só conseguiram 18 e 2% de inibição da população bacteriana, respectivamente, o EOM apresentou 100% de inibição em uma concentração de ITCA de aproximadamente 1µM/g de solo.

Pradhanang *et al.* (2003), ao avaliarem o efeito da fumigação de substrato com vários óleos essenciais sobre a população de *R. solanacearum*, não detectaram a bactéria no substrato quando este foi tratado por sete dias com óleos de palmarosa (*Cymbopogon martinii*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e tomilho (*Thymus vulgares*). Entretanto, estes resultados só foram obtidos a partir da concentração de 400µL/L de substrato, a qual é quatro vezes maior do que a concentração de EOM necessária pra atingir o mesmo resultado. Suhr & Nielsen (2003), ao avaliarem o efeito de tais óleos essenciais sobre diversos microrganismos, observaram maior efeito antimicrobiano do EOM em relação aos demais, sendo a toxicidade ainda maior quando utilizado na forma de vapores.

A utilização de EOM na concentração de 100 µL/L de solo além de ter proporcionado a não recuperação da bactéria no solo, foi capaz de controlar totalmente a incidência da murcha bacteriana no bioensaio com plantas de tomate. Isto mostra que a avaliação da eficiência do tratamento do solo com o EOM, através dos testes de recuperação da bactéria com a utilização do meio seletivo SMSA-E, permitiu estabelecer uma dose que foi também efetiva em testes com plantas indicadoras. Entretanto, diferenças entre os resultados poderiam existir, visto que a utilização de meios seletivos pode subestimar a concentração de inóculo, pois geralmente estes meios apresentam algum grau de repressão ao patógeno alvo (Pradhanang *et al.*, 2000). Além disto, a avaliação é feita com amostras do solo, o

que pode apresentar certa margem de erro. Isto pode ser observado no trabalho de Pradhanang *et al.* (2003), onde, utilizando também o meio seletivo SMSA-E, os óleos essenciais utilizados no estudo só foram capazes de inibir em 100% a incidência da doença em concentrações acima de 700 μ L/L de solo, 75% maior do que a concentração necessária para não recuperação da bactéria do solo.

O tratamento do solo com o EOM na concentração de 100 μ L de ITCA/L de solo possibilitou 100% de eficiência, tanto no teste de recuperação da bactéria no solo, quanto no bioensaio, em que o tempo e as condições de temperatura e umidade foram favoráveis ao aparecimento da doença. Sendo assim, acredita-se que esta concentração de EOM foi capaz de eliminar o patógeno do solo ou então reduzir a sua população a níveis tão baixos, que o impediram de causar a doença.

Olivier *et al.* (2006) afirmaram que o principal fator determinante para o sucesso da incorporação de tecidos de brássicas no controle da murcha bacteriana é a quantidade de matéria orgânica adicionada ao solo e não a ação dos isotiocianatos isoladamente. Sabe-se que a matéria orgânica é de fundamental importância para as melhorias das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, sua utilização é desejável no manejo desta doença. Entretanto, o uso destes materiais traz consigo algumas desvantagens, como a falta de uma padronização quanto à concentração de ITCA, a necessidade de grande quantidade de material vegetal e a dificuldade em executar uma armazenagem adequada, além da ocorrência de resultados inconsistentes (Dhingra *et al.*, 2004a; Zasada & Ferris, 2003). Além do mais, apenas com a utilização de um reagente de composição conhecida e constante é que se pode padronizar uma dose a ser utilizada. Sendo assim, é o ITCA pode ser utilizado na sua forma pura, pois o mesmo já pode ser produzido sinteticamente e a baixo custo (Dhingra *et al.*, 2004a).

Outra característica interessante do ITCA como produto para o tratamento do solo é que este tem demonstrado atividade herbicida para diversas plantas invasoras, sendo inclusive o mais eficiente dentre os vários isotiocianatos avaliados para este fim (Norsworthy & Meehan, 2005; Vaughn *et al.*, 2006). Entretanto, talvez a principal vantagem do ITCA em relação ao brometo de metila seja o pequeno impacto ambiental, por se tratar de um produto natural, e com baixa toxicidade a humanos. É importante citar que este produto é um aditivo presente em muitos alimentos e, em geral, considerado seguro ao consumo humano (Dunnick *et al.*, 1982), além de possuir propriedades anticancerígenas (Xiao *et al.*, 2003).

Levando-se em consideração os resultados aqui apresentados e o amplo espectro de ação verificado para o ITCA, este produto apresenta-se como um potencial substituto do brometo de metila. A sua utilização para o tratamento de substrato visando a produção de mudas é perfeitamente viável. O uso no campo pode ser executado em culturas de alto valor econômico ou em ambiente protegido. Já foi observado entre 60 e 80% de controle da murcha bacteriana do tomateiro no campo com o tratamento do solo com óleo essencial de tomilho (Ji *et al.*, 2005), o qual, em casa de vegetação, mostrou-se menos efetivo que o EOM no controle da doença. Assim, acreditamos que o EOM possa apresentar bons resultados na recuperação de campos de cultivo infestados com *R. solanacearum*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTHY, J.R., AKIEW, E.B., KIRKEGAARD, J.A. & TREVORROW, P.R. Using Brassica spp. as biofumigants to reduce the population of *Ralstonia solanacearum*. In: ALLEN, C., PRIOR, P. & HAYWARD, A.C. (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Mareeba: American Phytopathological Society 2005.
- BONANOMI, G., CHIURAZZI, M., CAPORASO, S., DEL SORBO, G., MOSCHETTI, G. & FELICE, S. Soil solarization with biodegradable materials and its impact on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1989-1998. 2008.
- BOREK, V., MORRA, M.J., BROWN, P.D. & MCCAFFREY, J.P. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in Soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43:1935-1940. 1995.
- BUDDENHAGEN, I. & KELMAN, A. Biological and Physiological Aspects of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 2:203-230. 1964.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253. 2004.
- CHESNEY, J.A., EATON, J.W. & MAHONEY, J.R., JR. Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds. *The Journal of Bacteriology* 178:2131-2135. 1996.
- CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control 1. *Annual Review of Phytopathology* 40:221. 2002.
- COHEN, M.F., YAMASAKI, H. & MAZZOLA, M. Brassica napus seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of Rhizoctonia root rot. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1215-1227. 2005.

- COX, S.D., GUSTAFSON, J.E., MANN, C.M., MARKHAM, J.L., LIEW, Y.C., HARTLAND, R.P., BELL, H.C., WARMINGTON, J.R. & WYLLIE, S.G. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology 26:355-358. 1998.
- DELAQUIS, P.J. & SHOLBERG, P.L. Antimicrobial Activity of Gaseous Allyl Isothiocyanate. Journal of food protection 60:943-947. 1997.
- DHINGRA, O.D., COSTA, M.L.N. & SILVA, G.J. Potential of allyl isothiocyanate to control *Rhizoctonia solani* seedling damping off and seedling blight in transplant production. Journal of Phytopathology 152:352-357. 2004a.
- DHINGRA, O.D., COSTA, M.L.N., SILVA, J.G.J. & MIZUBUTI, E.S.G. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. Fitopatologia Brasileira 29:683-686. 2004b.
- DUNIWAY, J.M. Status of Chemical Alternatives to Methyl Bromide for Pre-Plant Fumigation of Soil. Phytopathology 92:1337-1343. 2002.
- DUNNICK, I.K., PREJEAN, J.D., HASEMAN, J., THOMPSON, R.B., GILES, H.D. & MCCONNELL, E.E. Carcinogenesis Bioassay of Allyl Isothiocyanate. Toxicological Sciences 2:114-120. 1982.
- ELPHINSTONE, J.G., HENNESSY, J., WILSON, J.K. & STEAD, D.E. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26:663-678. 1996.
- HARVEY, S.G., HANNAHAN, H.N. & SAMS, C.E. Indian mustard and allyl isothiocyanate inhibit *Sclerotium rolfsii*. Journal of the American Society for Horticultural Science 127:27-31. 2002.
- HAYWARD, A.C. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87. 1991.
- JI, P., MOMOL, M.T., OLSON, S.M., PRADHANANG, P.M. & JONES, J.B. Evaluation of Thymol as Biofumigant for Control of Bacterial Wilt of Tomato Under Field Conditions. Plant Disease 89:497. 2005.
- KADO, C.J. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976. 1970.
- KAWAKISHI, S. & KANEKO, T. Interaction of oxidized glutathione with allyl isothiocyanate. Phytochemistry 24:715-718. 1985.
- KAWAKISHI, S. & KANEKO, T. Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. Journal of Agriculture and Food Chemistry 35:85-88. 1987.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695. 1954.
- KIRKEGAARD, J.A., SARWAR, M. & MATTHIESSEN, J.N. Assessing the biofumigation potential of crucifers. Acta Horticulturae 459:1998.
- KOKALIS-BURELLE, N. & RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Allelochemicals as biopesticides for management of plant parasitic nematodes. pp.15-29 In: Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases. 2006.

- LEMESSA, F. & ZELLER, W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control* 42:336-344. 2007.
- LIN, C.M., KIM, J., DU, W.X. & WEI, C.I. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. *Journal of food protection* 63:25-30. 2000a.
- LIN, C.M., PRESTON, J.F. & WEI, C.I. Antibacterial Mechanism of Allyl Isothiocyanate. *Food Protection* 63:727-734. 2000b.
- LÓPEZ-RÁEZ, J.A., CHARNIKHOVA, T., GÓMEZ-ROLDÁN, V., MATUSOVA, R., KOHLEN, W., DE VOS, R., VERSTAPPEN, F., PUECH-PAGES, V., BÉCARD, G., MULDER, P. & BOUWMEESTER, H. Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist* 178:863-874. 2008.
- MESSIHA, N., VAN DIEPENINGEN, A., WENNEKER, M., VAN BEUNINGEN, A., JANSE, J., COENEN, T., TERMORSHUIZEN, A., VAN BRUGGEN, A. & BLOK, W. Biological Soil Disinfestation (BSD), a new control method for potato brown rot, caused by *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *European Journal of Plant Pathology* 117:403-415. 2007.
- MOAT, A.G., FOSTER, J.W. & SPECTOR, M.P. *Microbial Physiology* (4th). New York: Wiley-Liss. 734p. 2002.
- NORSWORTHY, J.K. & MEEHAN, J.T. Herbicidal activity of eight isothiocyanates on Texas panicum (*Panicum texanum*), large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*), and sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Science* 53:515-520. 2005.
- OLIVIER, A.R., UDA, Y., BANG, S.W., HONJO, H., FUKAMI, M. & FUKUI, R. Dried Residues of Specific Cruciferous Plants Incorporated into Soil can Suppress the Growth of *Ralstonia solanacearum*, Independently of Glucosinolate Content of the Residues. *Microbes and Environments* 21:216-226. 2006.
- PRADHANANG, P.M., ELPHINSTONE, J.G. & FOX, R.T.V. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathology* 49:414-422. 2000.
- PRADHANANG, P.M., MOMOL, M.T., OLSON, S.M. & JONES, J.B. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Disease* 87:423-427. 2003.
- SANTOS, B.M., GILREATH, J.P., MOTIS, T.N., NOLING, J.W., JONES, J.P. & NORTON, J.A. Comparing methyl bromide alternatives for soilborne disease, nematode and weed management in fresh market tomato. *Crop Protection* 25:690-695. 2006.
- SCHAAD, N.W., JONES, J.B. & CHUN, W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (3th). Minnesota: American Phytopathological Society. 373p. 2001.
- SHARMA, J.P. & KUMAR, S. Effect of crop rotation on population dynamics of *Ralstonia solanacearum* in tomato wilt sick soil. *Indian Phytopathology* 57:80-81. 2004.
- SHIN, I.S., MASUDA, H. & NAOHIDE, K. Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Food Microbiology* 94:255-261. 2004.

- SHOFRAN, B.G., PURRINGTON, S.T., BREIDT, F. & FLEMING, H.P. Antimicrobial properties of sinigrin and its hydrolysis products. *Journal of Food Science* 63:621-624. 1998.
- SINGH, R.S. & SINGH, N. Effect of Oil-cake Amendment of Soil on Populations of Some Wilt causing Species of *Fusarium*. *Journal of Phytopathology* 69:160-167. 1970.
- SMITH, B.J. & KIRKEGAARD, J.A. In vitro inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology* 51:585-593. 2002.
- SONG, L., MORRISON, J.J., BOTTING, N.P. & THORNALLEY, P.J. Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC-MS/MS. *Analytical Biochemistry* 347:234-243. 2005.
- SUHR, K.I. & NIELSEN, P.V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology* 94:665-674. 2003.
- TIERENS, K.F.M.J., THOMMA, B.P.H.J., BROUWER, M., SCHMIDT, J., KISTNER, K., PORZEL, A., MAUCH-MANI, B., CAMMUE, B.P. & BROEKAERT, W.F. Study of the Role of Antimicrobial Glucosinolate-Derived Isothiocyanates in Resistance of Arabidopsis to Microbial Pathogens. *Plant Physiology* 125:1688-1699. 2001.
- VAUGHN, S.F., PALMQUIST, D.E., DUVAL, S.M. & BERHOW, M.A. Herbicidal activity of glucosinolate-containing seedmeals. *Weed Science* 54:743-748. 2006.
- XIAO, D., SRIVASTAVA, S.K., LEW, K.L., ZENG, Y., HERSHBERGER, P., JOHNSON, C.S., TRUMP, D.L. & SINGH, S.V. Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Carcinogenesis* 24:891-897. 2003.
- ZASADA, I.A. & FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to Isothiocyanates in Laboratory Assays. *Phytopathology* 93:747. 2003.
- ZASADA, I.A. & FERRIS, H. Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1017-1024. 2004.

CONCLUSÕES GERAIS

Dentre os meios seletivos avaliados, apenas os meios SM e SMSA-E demonstraram sensibilidade adequada para utilização em trabalhos com isolados brasileiros de *R. solanacearum*.

Por apresentar menor índice de repressão, maior taxa de recuperação e colônias morfológicamente semelhantes às apresentadas pelo meio TTC, o meio SMSA-E apresenta grande potencial para a detecção e a quantificação da bactéria no solo.

Os vapores do EOM foram capazes de inibir o desenvolvimento de colônias de *R. solanacearum in vitro* bem como inibir o crescimento de colônias em estágios avançados de desenvolvimento.

A exposição de colônias de *R. solanacearum* à concentrações crescentes dos vapores do EOM ocasionou o aumento do extravasamento de metabólitos intracelulares. Bactérias gram-positivas e anaeróbicas facultativas foram menos sensíveis ao produto que bactérias gram-positivas e aeróbicas estritas.

Não foi possível a recuperação de *R. solanacearum* do solo infestado, quando este foi tratado com EOM na concentração de 100µL de ITCA/L de solo, por sete dias. Este mesmo tratamento foi capaz de controlar totalmente a doença e, mesmo em concentrações menores, a incidência da murcha bacteriana foi menor que a observada no tratamento controle, além de ter proporcionado um atraso substancial no início da epidemia.