

## Ação *in vitro* de produtos químicos sobre *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*.

Abadia dos Reis Nascimento<sup>1</sup>, Paulo Marçal Fernandes<sup>2</sup> e Alice Maria Quezado-Duval<sup>2</sup>

<sup>1, 2</sup>, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás – UFG, 74001970 Goiânia - GO. reyzynha@yahoo.com.br; pmarta@terra.com.br., <sup>3</sup>Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970 Brasília-DF; E-mail: alice@cnph.embrapa.

### RESUMO

A ação *in vitro* dos produtos fosfito; acibenzolar-S-metil (ASM); metiram + piraclostrobina; hidróxido de cobre WP; cloretos de benzalcônio; famaxodona + mancozebe e hidróxido de cobre WDG foi avaliada sobre *X. perforans* e *X. gardneri*, utilizando-se um isolado de cada espécie. O estudo foi desenvolvido na Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. Cada produto e cada isolado foram testados em experimentos independentes, nas dosagens 1- 0, 2- 1/100X (100 vezes menor), 3- 1/10X (10 vezes menor), 4- dose recomendada do produto comercial, 5- 10X(10 vezes maior) e 6- 100X (100 vezes maior). O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições. A parcela foi uma placa de petri contendo o meio Nutriente-Ágar impregnado com suspensão bacteriana. Em cada placa foram colocados discos de papel de filtro de diâmetro 0,6 cm, embebidos em suspensões de cada produto nas diferentes concentrações. As placas foram incubadas a 28°C por 48h, quando então avaliou-se o diâmetro do halo de inibição formado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os produtos à base de fosfito e ASM não apresentaram atividade sobre nenhum dos isolados. O produto metiram + piraclostrobina apresentou formação do halo a partir da dose recomendada do produto comercial para *X. gardneri*. Enquanto que para *X. perforans* o halo de inibição se formou a partir da dosagem 10 vezes maior a dosagem

recomendada. Com os produtos hidróxido de cobre WP e hidróxido de cobre WDG, a formação do halo só ocorreu apareceu na maior concentração para o isolado de *X. perforans* e isolado de *X. gardneri*, indicando baixa sensibilidade a este princípio ativo. Com os produtos cloreto de benzalcônio e famoxadona + mancozebe a formação do halo apareceu a partir da dosagem recomendada do produto para os isolados das bactérias *X. perforans* e *X. gardneri*. O isolado de *X. perforans* aparentemente é menos sensível as moléculas estudadas em geral comparadas com o isolados da *X. gardneri*.

**Palavras-chave:** controle químico, mancha bacteriana, bactérias, tomateiro

### ABSTRACT

**Action *in vitro* the chemical products *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*.**

The action *in vitro* of the chemical products phosphite; acibenzolar-s-methyl (ASM); methiram + pyraclostrobin; copper hydroxide WP; benzalkonium chloride; famaxodone + mancozebe and copper hydroxide WDG was evaluated on *X. perforans* and *X. gardneri*, being used an isolated of each species. The study was developed the Fitopatologia of Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. Each product and each isolated one was tested in independent experiments, in the dosages 1 - 0, 2- 1/100X

(hundred fold lower), 3- 1/10 (ten fold lower), 4- dose recommended in label of the commercial product, 5- 10X (ten fold higher) 6- 100X (hundred fold higher). The experiments were designed as a randomized complete block design, with four replications. The plots were constituted of a Petri plate containing the media Nutrient-Agar impregnated with the bacterial suspension. In each plate, disks of filter paper of diameter 0,6 cm were put, soaked in suspensions of each product in the different concentrations. The plates were incubated to 28°C by 48hs, when the inhibition formed halo was evaluated. The averages were compared by the test of Tukey at 5%. Phosphite and ASM did not present bactericide activity on none of the isolates. There was no halo formation

by methiram + pyraclostrobin up to the recommended dose for *X. gardneri*. On the other hand, for *X. perforans*, the halo started from to ten fold higher dose. On the products copper hydroxide WP and copper hydroxide WDG, the formation of the halo only appeared in the higher concentration for both isolates/species, indicating low sensibility. With the products benzalkonium chloride and famoxadone + mancozebe the halo formation started from the recommended dose also for both isolates/species. The isolate of *X. perforans* seemed to be less sensitive to the molecules studied, compared with the isolate of *X. gardneri*.

**Keywords:** Chemical control, bacterial spot, bacteria, tomato

A mancha-bacteriana é considerada umas das doenças mais importantes do tomate para processamento industrial, levando à redução da produtividade pela destruição da área foliar, derrubada de flores e frutos em formação e diminuição do °Brix nos frutos pela exposição direta ao sol (Lopes & Quezado-Duval, 2005). Em condições experimentais de campo, sob irrigação por aspersão, registrou-se uma redução de até 52% da produção de tomate para indústria devido à mancha-bacteriana (Quezado-Soares et al., 1998). A mancha-bacteriana é uma doença de difícil controle, principalmente em condições de altas umidades e temperatura elevada. Corrobora para isso, a ausência de cultivares com alto grau de resistência e a eficiência variável dos produtos químicos utilizados para o controle, notadamente fungicidas cúpricos e antibióticos agrícolas (Lopes & Quezado-Duval, 2005). O aparecimento de isolados resistentes a esses princípios ativos parece está estreitamente relacionado com este fato (Quezado-Duval, 2003).

A resistência a produtos cúpricos em bactérias fitopatogênicas foi observada pela primeira vez em *Xanthomonas* spp. causando a mancha-bacteriana em pimentão (Marco & Stall, 1983). Já para os antibióticos, resistência à estreptomina foi observada pela primeira vez no início dos anos 60 (Stall & Thayer, 1962). Em levantamento realizado em lavouras de tomate indústria, avaliou-se, *in vitro*, a sensibilidade ao cobre, oxitetraciclina e estreptomina de 389 isolados de *Xanthomonas* spp. Nenhum dos isolados utilizados foi resistente ao cobre na concentração de 200 mg/ml, mas em concentrações mais baixas (50 mg/ml) foram detectados isolados resistentes (Quezado-Duval, et al., 2003).

Além de antibióticos e produtos à base de cobre para o controle de doenças bacterianas, detém registro no Brasil junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a cultura do tomate, com indicação para a mancha-bacteriana, dois outros princípios ativos: a molécula acibenzolar-S-methyl, com ação de indução de resistência da planta, e os cloretos de benzalcônio, que são amônias quaternárias.

Especula-se que outras moléculas registradas para a cultura do tomateiro para o controle de outros patógenos possam também ter alguma ação de controle sobre a mancha bacteriana. Nesse sentido, a famoxadona, registrada no Brasil em mistura com o mancozebe para o controle da requeima (*Phytophthora infestans*), tem apresentado resultados promissores nos EUA para o controle da mancha-bacteriana e da pinta-bacterina (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) (Shepherd et al., 2004). Outro produto aventado foi o metiram + piraclostrobina, que é registrado para os fungos *P. infestans* e *Septoria lycopersici* no tomateiro, que segundo relato de alguns técnicos das indústria dá um “efeito verde” sendo talvez efetivo para a mancha-bacteriana. Além desses, o fosfito, que é registrado como fungicida em alguns países e no Brasil como fertilizante (Nascimento, 2006), tem sido aventado como um indutor de resistência também para a referida bacteriose. O fosfito é um produto que possui um modo de ação direto, agindo como uma toxina sobre os fungos (Guest & Grant, 1991) e indireto estimulando a formação de substância natural de auto defesa (Dercks & Creasy, 1989). Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação de inibição *in vitro* causada por (fosfito, acibenzolar-s-metil (ASM), metiram + piraclostrobina, hidróxido de cobre WP, cloretos de benzalcônio, famaxodona + mancozebe e hidróxido de cobre WDG), que são novas moléculas disponíveis no mercado nacional, sobre os patógenos *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*, presentes nas lavouras de tomate, visando a sanidade da cultura do tomateiro.

## MATERIAS E MÉTODOS

Este ensaio foi realizado no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, de março a abril de 2008. Foram realizados ensaios independentes no mesmo período. Foram testados sete produtos (Tabela 1) e cada produto foi avaliado em 6 concentrações, sendo 1ª. 0 (água), 2ª. 100X< (100 vezes menor a dosagem recomendada em rótulo do produto comercial), 3ª. 10X< (10 vezes menor a dosagem recomendada em rótulo do produto comercial), 4ª. dose recomendada em rótulo do produto comercial, 5ª 10X> (10 vezes maior a dosagem recomendada em rótulo do produto comercial) e 6ª. 100X> (100 vezes maior a dosagem recomendada em rótulo do produto comercial) (Tabela 2). No entanto, o delineamento experimental para cada ensaio foi em blocos casualizados, com seis tratamentos e quatro repetições (uma placa/repetição).

Foi utilizado um isolado de cada espécie de *X. perforans* (EH 2005-54) e *X. gardneri* (EH 2006-17) associadas à mancha-bacteriana do tomateiro. As placas foram incubadas a 28°C por três dias para o crescimento das colônias. Após esse período colônias individuais foram repicadas para o mesmo tipo de meio e incubadas nas mesmas condições por mais três dias para preparo da suspensão bacteriana. Foram preparadas 56 placas de plástico, marcadas atrás com as concentrações dos produtos e na tampa a espécie da bactéria. Foi preparado 2,5 L de NA – Nutriente-Ágar e verteu-se nestas placas. A suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro em aproximadamente 108ufc/mL (A600=0,1) e adicionado 2,5 ml desta suspensão em um becker contendo 250 ml de Na a 0,5%. A mistura resultante foi depositada sobre as placas contendo meio NA já solidificado. Após este procedimento, foram colocados em cada placa discos de papel de filtro estéreis, de diâmetro 0,6 cm, embebidos em suspensões dos produtos em testes nas diferentes concentrações. As placas foram então incubadas a 28°C por 48hs. Ao final desse período

avaliou-se o halo de inibição formado e subtraindo-se o diâmetro do papel de filtro (0,6 cm). As médias dos resultados foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O produto fosfito apresentou efeito sobre *X. perforans* e *X. gardneri*, mesmo na maior concentração do produto (Tabela 3). Há relatos, de que os fosfitos, possuem ação como toxina direta sobre alguns fungos, além de ativar a defesa natural da planta (Guest & Grant, 1991). O acibenzolar-S-metil também não apresentou ação direta sobre as duas espécies de bactérias até a concentração de 5.000 ppm. Esses resultados de não apresentarem ação direta sobre as bactérias era esperado, já que o fosfito e acibenzolar-S-methyl são considerados indutores de resistência.

Com o metiram + piraclostrobina houve formação do halo a partir da 4ª concentração, dosagem recomendada, para o isolado de *X. gardneri*, havendo diferença estatística entre as concentrações 4ª (dose recomendada), a 5ª (10X>) e a 6ª (100X>) (Tabela 3), com diâmetro do halo aumentando de acordo com a maior concentração utilizada. Enquanto para *X. perforans* o halo apareceu a partir da 5ª concentração (10X>). Havendo também diferença significativa entre a 5ª concentração (10X>) e a 6ª concentração (100X>) do produto sobre o isolado de *X. perforans*.

Este produto está sendo muito utilizado no controle da mancha bacteriana na região centro oeste pelos produtores de tomate industrial. É um produto registrado para *Phytophthora infestans* e *Septoria lycopersici* no tomateiro, possuem duplo modo de ação, atuando através do ingrediente ativo Pyraclostrobin como inibidor do transporte elétricos nas mitocôndrias das células dos fungos, inibindo a formação de ATP, e através do ingrediente ativo Metiram o qual se decompõe formando compostos tóxicos, que reagem inespecificamente com enzimas sulfídricas, as quais estão largamente distribuídas na célula do fungo (Agrofit, 2007).

Os produtos hidróxido de cobre WP e hidróxido de cobre WDG, ambos à base de cobre, a formação do halo só apareceu na maior concentração para os dois isolados das espécies de bactérias estudadas, indicando baixa sensibilidade a este princípio ativo. Resultados semelhantes foram encontrados em isolados de *Xanthomonas* da mancha bacteriana em pimentão (Marco & Stall, 1983; Buonauro et al., 1994), em isolados de *Xanthomonas* spp. de tomate e pimentão, originados principalmente do Rio de Janeiro e São Paulo (Aguilar et al., 2000).

Com o produto cloreto de benzalcônio a formação do halo apareceu a partir da 4ª concentração para os dois isolados de cada espécie de bactérias *X. perforans* e *X. gardneri*. Para *X. perforans* não houve diferença estatística entre as concentrações 4ª (dosagem recomendada) e 5ª (10X>), só havendo diferença para a 6ª concentração (100X>) (Tabela 3). Já para *X. gardneri* houve diferença estatística entre as três concentrações 4ª (dose recomendada), 5ª (10x>) e 6ª (100X>), sendo que quanto maior foi a concentração maior foi o diâmetro do halo (Tabela 3). Souza (2006) avaliando a eficiência do cloreto de benzalcônio observou que tanto no teste qualitativo, onde o produto é impregnado ao meio de cultura, como no teste quantitativo, onde a bactéria é impregnada, houve diferenças no crescimento dos isolados representantes de cada uma das quatro espécies de *Xanthomonas* que causam a mancha-bacteriana (dois isolados de cada), dependendo da concentração testada.

Com o produto famoxadona + mancozebe a formação do halo apareceu a partir da 4ª concentração (dose recomendada) para *X. perforans* e *X. gadneri*. No entanto, para *X. perforans* não houve diferença estatística entre a dosagem recomendada (4ª) com as dosagens inferiores 1ª, 2ª e 3ª concentração, só havendo diferença estatística entre a 4ª (dosagem recomendada) com a 5ª (10X>) e 6ª (100X>) concentração (Tabela 1). Já para *X. gardneri* houve diferença estatística entre as três maiores concentrações 4ª (dose recomendada), 5ª (10X>) e 6ª (100X>), sendo que quando maior foi a concentração maior foi o diâmetro do halo. Esse produto, que tem registro para a cultura do tomate, com indicação para as doenças fúngicas requeima (*Phytophthora infestans*) e pinta-preta (*Alternaria solani*), foi incluído no ensaio, por conter a molécula famoxadona, que tem apresentado efeito de controle da mancha-bacteriana nos EUA (Shepherd et al., 2004). O atual trabalho pode ser considerado o primeiro ensaio de inibição *in vitro* com englobando as espécies *X. perforans* e *X. gardneri* oriundas de lavouras de tomate para processamento no Brasil. As espécies tem sido associadas a ocorrências de severas epidemias da mancha-bacteriana no Estado de Goiás. O controle químico é ainda a principal ferramenta para o manejo dessa doença na cultura do tomate indústria, mas sua eficiência tem sido variável. No presente trabalho verificou-se o potencial de alguns produtos de ação direta para o controle de ambas espécies, como os cloretos de benzalcônio e famoxadona + mancozebe. O metiram + piraclostrobina mostrou potencial de controle apenas para o isolado de *X. gardneri*. O isolado da *X. perforans* aparentemente é menos sensível às moléculas dos produtos testados. Para a confirmação dessa hipótese, vários isolados deverão ser analisados.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Paulo Marçal Fernandes e Alice Maria Quezado-Duval. Universidade Federal de Goiás-UFG, Embrapa Hortaliças e CAPES pela bolsa concedida.

## REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso em: 29-12-2008.
- AGUIAR, L.; KIMURA, O.; CASTILHO, A.M.C.; CASTILHO, K.S.C.; RIBEIRO, R.L.D.; AKIBA, F.; CARMO, M.G.F. 2000. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. *Agronomia* 34:78-82.
- BUONAURIO, R.; STRAVATO, V.M.; SCORTICHINI, M. 1994. Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annum* L. in Italy. *Plant Disease* 78:296-299.
- DERCKS, W.; CREASY, L. L. 1989. Influence of fosetyl – Al on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34:203-213.
- GUEST, D.; GRANT, B. R. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews* 66:159-187.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, M. A. 2005. Doenças bacterianas. In: LOPES, C. A.; ÀVILA, A. C. Doenças do tomateiro. Brasília BR. EMBRAPA-CNPQ. pp. 62-64.

MARCO, G.M. & STALL, R.E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* 67:779-781. 1983.

NASCIMENTO, A. D.R. **Efeitos de fosfitos sobre a sanidade das plantas e produtividade na cultura do tomate.** 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

QUEZADO-DUVAL, A. M. Q. 2003. Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana em tomateiro para processamento industrial no Brasil. Tese de doutorado. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

QUEZADO-DUVAL, A.M., GAZZOTO FILHO, A., LEITE JÚNIOR, R.P. & CAMARGO, L.E.A. 2003. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. Associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* 21:670-675.

QUEZADO-SOARES, A. M.; SILVA, V. L.; GIORDANO, L. de B.; LOPES, C. A. Redução da produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha bacteriana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 38., 1998, Petrolina. **Resumo...** Petrolina: SOB, 1998. p.266.

SHEPHERD, C.; WILLIAMS, R.; SOEHNER, S. Controlling fungal and bacterial diseases of tomatoes with Tanos™, a new fungicide from DuPont. In: Momol, M.T.; Jones, J.B. 1st International Symposium on Tomato Diseases and 19th Annual Tomato Disease Workshop. University of Florida/IFAS Extension/IHS. 2004. p. 48.

STALL, R.E.; THAYER, P.L. 1962. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Disease Reporter* 46:389-392.

**Tabela 1.** Produtos utilizados com seus respectivos ingredientes ativos, formulações, quantidade de ingrediente ativo e dosagem recomendada do produto comercial.

Nome comercial	Nome técnico (ingrediente ativo e formulação)	Quantidade de Ingrediente ativo (g/L,kg)	'Dose P.C (Kg, L /ha)
1. Hortifós®	Fosfito de K ( 28 % de P O <sub>5</sub> e 26%; K O <sub>2</sub> ) (SL)	28% e 26%	3 L
2. Bion®	acibenzolar-S-metIL (WG)	500 g/kg	25 g
3. Cabrio Top®	metiram + piraclostrobina (WG)	550 + 50 g/kg -	3kg
4. Garra 450®	hidróxido de cobre (WP)	691 g/kg	3,0 Kg
5. Fegatex®	cloreto de benzalcônio (SL)	100 g/L	3 L
6. Midas®	famoxadona + mancozebe (GDA)	62,5 + 625 g/kg	1,6Kg
7. Kocide®	hídrido de cobre (WDG)	538 g/kg	1,5Kg

**Tabela 2.** Concentrações dos produtos químicos em ppm. Brasília-DF, 2008.

Tratamentos Concentrações dos produtos	Dosagem (ppm)	Experimentos											
		1. Hortifós	2. Bion	3. Cabrio Top	4. Garra	5. Fegatex	6. Midas	7. Kocide	Estoque	Água			
1 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10 mL
2 <sup>a</sup>	100<	20	0,5	30	37	25	20	30	1 mL	9.999 mL			
3 <sup>a</sup>	10≤	200	5	300	370	250	200	300	10 mL	9.990 mL			
4 <sup>a</sup>	Dose Rec.	2.000	50	3.000	3.700	2.500	2.000	3000	100 mL	9.900 mL			
5 <sup>a</sup>	100>	20.000	500	30.000	37.000	25.000	20.000	30.000	1 mL	9 mL			
6 <sup>a</sup>	[ ]Estoque*	200.000	5.000	300.000	370.000	250.000	200.000	300.000	10mL	0 mL			
	Estoque	4 mL	0,1 g	6 g	7,4 g	5 mL	4 g	6 g	-	-			

**Tabela 3** Ação dos produtos químicos *in vitro* sobre a *X. perforans* e *X. gardneri*, Brasília-DF, 2008.

Tratamentos Concentrações dos produtos	Dosagens (ppm)	Diâmetro médio em cm dos halos de inibição nas concentrações (ppm) empregadas											
		Experimentos						Experimentos					
		2. Aciben zolar-I S-meti		3. metiram + piraclostrobina		4. hidróxido de cobre (WP)		5. cloreto de 'benzalcônio		6. famoxadona + mancozebe		7. hidróxido de cobre (WDG)	
		XP	XG	XP	XG	XP	XG	XP	XG	XP	XG	XP	XG
1 <sup>a</sup>	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2 <sup>a</sup>	100 <sup>3</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4 <sup>a</sup>	Dose rec. <sup>1</sup>	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,23	0,13	0,03	0,73	0,00	0,00
5 <sup>a</sup>	10 <sup>&gt;</sup>	0,00	0,00	0,35	1,45	0,00	0,00	0,23	1,10	0,13	1,30	0,00	0,00
6 <sup>a</sup>	100 <sup>&gt;</sup>	0,00	0,00	1,40	1,90	0,20	0,45	0,85	1,53	0,35	2,58	0,08	0,30
CV%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,28	7,37	4,51	11,95	0,00	20,20	0,00	0,00

\* médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

<sup>1</sup> Dosagem recomendada em rótulo dos produtos comerciais em ppm: Fosfito (2.000); acibenzolar-S-metil (50); metiram + piraclostrobina (3.000); hidróxido de cobre líquido (3.700); cloreto de benzalcônio (2.500); famoxadona + mancozebe (2.000); hidróxido de cobre (3.000).

<sup>2</sup> Dosagem dez vezes maior a dosagem recomendada pelo fabricante.

<sup>3</sup> Dosagem cem vezes maior a dosagem recomendada pelo fabricante.