

## EFEITO DO EXTRATO DE ALHO NA QUEBRA DE DORMÊNCIA DE GEMAS DE VIDEIRAS E NO CONTROLE *in vitro* DO AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE (*Elsinoe ampelina* Shear)<sup>1</sup>

RENATO VASCONCELOS BOTELHO<sup>2,5</sup>, ALINE JOSÉ MAIA<sup>3</sup>,  
ERASMO JOSÉ PAIOLI PIRES<sup>4,5</sup>, MAURILO MONTEIRO TERRA<sup>4,5</sup>

**RESUMO** – Considerando a redução ou eliminação do uso de substâncias sintéticas que preconizam os sistemas sustentáveis de produção de frutas, este trabalho teve como objetivo a busca de novas alternativas para a quebra de dormência e o controle de doenças em videiras. Estacas de videira contendo uma gema foram pulverizadas com os seguintes tratamentos: 1) testemunha; 2) OV (óleo vegetal) 1%; 3) extrato de alho (EA) 3%; 4) EA 3% + OV 1%. Posteriormente, as estacas foram mantidas em câmara de crescimento (25±2.5°C) por 56 dias. O único tratamento que estimulou a brotação das estacas de videira cv. Isabel Precoce foi o EA 3% + OV 1%, que atingiu 35% de brotação, diferindo estatisticamente dos tratamentos- testemunha (12,5%), OV 1% (17,5%) e EA 3% (15,0%). Provavelmente, o estágio de endodormência profunda das gemas, após apenas 90 horas de frio (≤ 7,0°C), impediu melhores resultados dos tratamentos para quebra de dormência. Três experimentos, foram conduzidos *in vitro*, com diferentes doses de extrato de alho, com o objetivo de avaliar o controle do fungo *Elsinoe ampelina*. Em todos os experimentos, houve efeito quadrático no crescimento micelial, sem ter havido diferenças entre os tratamentos com extrato de alho, evidenciando o seu efeito fungicida, mesmo na dose mais baixa de EA (0,0615%).

**Termos para indexação:** *Vitis*, uvas, dormência, brotação, fitopatologia, doença fúngica.

## EFFECT OF GARLIC EXTRACT ON BUD BREAK OF GRAPEVINES AND *in vitro* CONTROL OF CAUSAL AGENT OF ANTRACNOSE (*Elsinoe ampelina* Shear)

**ABSTRACT** - Considering the reduction or elimination of synthetic compounds used in sustainable fruit production systems, this work aimed to search for new alternatives for bud break dormancy and diseases control in grapevines. Single-bud cuttings of grapevines were sprayed with the following treatments: 1) control, 2) 1% SO (soybean oil), 3) 3% GE (garlic extract), 4) 3% GE + 1% SO. After that, the cuttings were kept in a growth chamber (25±2.5°C) for 56 days. The unique treatment that stimulated sprouting of grapevines cv. Isabel Precoce was 3% GE + 1% S), that reached 35% sprouting, differing statistically from the control (12.5%), 1% SO (17.5%) and 3% GE (15.0%). Probably, the stage of deep endodormancy of buds, after only 90 chilling hours (≤ 7.0°C), avoided better results of bud breaks treatments. Three experiments were carried out *in vitro*, with different garlic extract doses aiming to evaluate the control of the fungus *Elsinoe ampelina*. In all trials, there were quadratic effects on mycelial growth, without differences between garlic extract treatments, evidencing its fungicide effect, even for the lowest dose of 0.0615% GE.

**Index terms:** *Vitis*, grapes, dormancy, sprouting, phytopathology, fungus disease.

<sup>1</sup>(Trabalho 031-08). Recebido em: 28-01-2008. Aceito para publicação em: 20-11-2008.

<sup>2</sup>Eng. Agr. Dr. Prof. Adjunto. Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO. R. Simeão Varella de Sá n° 03, CEP 85040-080 Guarapuava-PR. E-mail: rbotelho@unicentro.br

<sup>3</sup>Eng. Agr. Mestranda em Produção Vegetal. Departamento de Agronomia, UNICENTRO.

<sup>4</sup>Eng. Agr. Dr. Pesquisador Científico. Instituto Agronômico de Campinas. Caixa Postal 28, CEP 13001-970 Campinas-SP.

<sup>5</sup>Bolsistas de Produtividade CNPq.

## INTRODUÇÃO

A brotação irregular de videiras, principalmente em regiões com invernos amenos, pode torna-se um fator limitante na produção comercial de uvas. De maneira geral, um período de frio é necessário para superar o estado de dormência e promover a brotação uniforme das gemas (Lavee & May, 1997). O período de exposição ao frio para a quebra de dormência das gemas de videiras varia entre 50 e 400 horas a temperaturas abaixo de 7°C, dependendo da cultivar (Dokoozlian, 1999).

Muitos compostos têm efeito na superação da dormência de plantas frutíferas de clima temperado, no entanto, atualmente, a cianamida hidrogenada ( $H_2CN_2$ ) é o produto mais utilizado na viticultura mundial. Em 2001, cerca de 112.490kg de cianamida hidrogenada foram usados nos Estados Unidos e 36.287kg na Itália, principalmente na cultura da videira (Settimi et al. 2005).

Levando-se em consideração a redução ou a eliminação do uso de substâncias sintéticas que preconizam os sistemas sustentáveis de produção de frutas, a busca de novas alternativas para a quebra de dormência de fruteiras de clima temperado torna-se bastante importante. A cianamida hidrogenada, particularmente, é um produto altamente tóxico, sendo classificado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos na categoria mais alta de toxicidade (Categoria I). Além disso, o registro desse produto está sob revisão pelas autoridades da União Européia (Settimi et al., 2005).

Procurando por novas alternativas para quebra de dormência, Kubota & Miyamuki (1992) verificaram que a pasta de alho aplicada sobre a superfície dos cortes de varas da videira 'Moscatel de Alexandria', logo após a poda, foi mais eficiente que a cianamida cálcica ( $CaCN_2$ ), o produto mais usado para videiras no Japão. Resultados satisfatórios também foram obtidos com óleo de alho a 20% em videiras 'Pione' e 'Thompson Seedless' (Kubota et al. 2000). Botelho et al. (2007) verificaram 37% e 75% de gemas brotadas, em estacas de videiras cv. Cabernet Sauvignon, tratadas com extrato de alho a 3%, submetidas a 0 e 168 horas de frio ( $\leq 7,0^\circ C$ ), respectivamente. De acordo com Kubota et al. (1999), a substância ativa no extrato de alho responsável pela quebra de dormência são compostos voláteis contendo enxofre e um grupo alil.

Além deste efeito na quebra de dormência de plantas, na área da medicina humana, vários trabalhos vêm apresentando resultados promissores de produtos à base de alho no controle de doenças parasitárias tanto de origem bacteriana

(*Helicobacter pylori*) como fúngica (*Candida albicans*) (O'Gara, 2000; Lemar et al., 2005), o que poderia representar um novo campo de estudo para o desenvolvimento de novas metodologias para o controle de doenças em plantas.

Uma das principais doenças da videira é a antracnose, causada pelo fungo *Elsinoe ampelina* Shear (sin. *E. viticola* Racib.). O sintoma típico da doença é caracterizado por manchas foliares circulares, com margens marrons a negras e bordos redondos ou irregulares. Infecta todos os órgãos verdes da planta (folhas, gavinhas, ramos, inflorescência e frutos), sendo que, nas bagas aparecem manchas circulares de cor cinza no centro e preta nas bordas, comumente denominadas de "olho-de-passarinho". Períodos chuvosos prolongados, umidade relativa alta, uma lâmina de água livre sobre os tecidos suscetíveis durante, no mínimo, 12 horas e temperaturas entre 2 e 30°C (ótima de 24-26°C) são condições que favorecem o desenvolvimento da doença. No início da brotação, a alta umidade e os tecidos tenros favorecem a infecção, assim o controle deve ser iniciado nesta fase (Grigoletti & Sonego, 1993; Sonego, 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do extrato de alho na quebra de dormência de videiras e no controle *in vitro* do fungo *Elsinoe ampelina*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Quebra de dormência de gemas de videiras cvs. Cabernet Sauvignon e Isabel Precoce

Videiras das cultivares Cabernet Sauvignon e Isabel Precoce, cultivadas no pomar experimental da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), em Guarapuava-PR, foram podadas em 07-05-2007, por ocasião da queda natural das folhas. As varas foram então mantidas em câmara fria a  $3,5 \pm 2,5^\circ C$  por 90 horas, com o objetivo de induzir a dormência das gemas.

Para cada cultivar de videira, estacas sem folhas e com uma única gema dormente (cerca de 1cm de diâmetro) foram preparadas e montadas em espumas fenólicas sobre bandejas plásticas permanentemente mantidas com uma lâmina de água destilada. Logo após o preparo, as estacas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento, com os seguintes tratamentos: 1) testemunha (sem tratamento); 2) OV (óleo vegetal) a 1%; 3) EA (extrato de alho) a 3%; 4) EA a 3% + OV a 1%.

Para os tratamentos 3 e 4, utilizou-se o Bioalho® (Natural Rural S.A., Araraquara-SP), produto natural obtido da extração a frio do extrato

de alho por prensagem, sendo totalmente solúvel em água. Como óleo vegetal, foi utilizado um produto comercial à base de óleo emulsionável de soja (Natural Rural S.A., Araraquara-SP).

Depois dos tratamentos, as bandejas foram colocadas em câmaras de crescimento à temperatura de  $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$ , com 12 horas de fotoperíodo. A porcentagem de gemas brotadas foi avaliada aos 0; 14; 28; 42 e 56 dias após os tratamentos (DAT), considerando para isto o estágio fenológico de "ponta verde".

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 4 \times 5$  (cultivares  $\times$  tratamentos  $\times$  dias após tratamento), com quatro repetições e parcela experimental composta por 20 estacas. Os resultados foram submetidos à análise de variância, estudando-se a interação entre os fatores. Para comparação entre médias, aplicou-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

#### **Controle *in vitro* do fungo *Elsinoe ampelina***

Neste trabalho, foram realizados três experimentos *in vitro* com um isolado do fungo *E. ampelina*, estudando-se o efeito de diferentes doses de extrato de alho. No primeiro experimento, utilizaram-se as doses de 0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5%. No segundo, as doses de 0; 0,15; 0,3; 0,45; 0,6 e 0,75% e, no terceiro, 0; 0,0625; 0,1250; 0,1875; 0,2500 e 0,3120%.

O extrato de alho (Bioalho®) foi adicionado ao meio de cultura BDA fundido (temperatura aproximada de  $45^\circ\text{C}$ ), obtendo-se as concentrações acima mencionadas. O meio de cultura nas diferentes concentrações do extrato de alho foi vertido em placas de Petri de 9cm de diâmetro, utilizando-se de 15mL por placa. No centro de cada placa, foi disposto um disco com 5mm de diâmetro, retirado de culturas com crescimento ativo do isolado de *E. ampelina*, os quais foram cultivados em meio BDA sob condições controladas ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas), durante quatro dias. No tratamento-testemunha, não houve adição de extrato de alho. As placas foram mantidas em temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 12 horas, durante 4 dias. Depois desse período, foi mensurado o diâmetro médio das colônias.

Para cada um dos experimentos, o delineamento foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos, quatro repetições e uma placa de Petri por unidade amostral. Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Quebra de dormência de gemas de videiras cv. Cabernet Sauvignon e Isabel Precoce**

Para as avaliações de brotação, houve interação entre os fatores. As estacas de videiras cv. Cabernet Sauvignon não apresentaram brotação durante todo o período de avaliação, excetuando-se o tratamento de EA 3% + OV 1%, que atingiu apenas 3,8% de gemas brotadas aos 56 DAT (dias após tratamentos). Estes resultados foram muito inferiores àqueles obtidos para a mesma cultivar por Botelho et al. (2007) que, utilizando extrato de alho 3% sem adição de óleo vegetal, verificaram 37% e 75% de gemas brotadas 35 dias após o tratamento, para estacas submetidas a 0 e 168 horas de frio (de  $7,0^\circ\text{C}$ ), respectivamente.

Aparentemente, estes resultados distintos podem ter sido decorrentes da diferença entre os estádios de dormência das gemas por ocasião da indução da brotação. De acordo com Lavee & May (1997), na fase de endodormência profunda, não é mais possível ocorrer brotação, quaisquer que sejam as condições externas. Provavelmente, Botelho et al. (2007) obtiveram maior êxito no estímulo da brotação de gemas da videira cv. Cabernet Sauvignon tratadas com extrato de alho por estas se encontrarem, no momento do estímulo, nas fases de pré-dormência (0 hora de frio), quando a brotação é impedida, basicamente apenas por inibição correlativa; ou em um estágio de endormência menos profunda, após maior acúmulo de frio (168 horas de frio), comparado ao presente trabalho (90 horas de frio), quando possivelmente os níveis de ABA (ácido abscísico) eram máximos no início da endodormência, inibindo o crescimento (Pinto et al., 2007).

A resposta a outras substâncias que promovem a brotação, como, por exemplo, a cianamida hidrogenada, também é bastante dependente da profundidade da endormência das gemas (Lavee & May, 1997). Segundo Botelho et al. (2007), a necessidade de frio para a superação natural da dormência de videiras da cv. Cabernet Sauvignon situa-se entre 336 e 504 horas, muito acima das 90 horas de frio a que foram submetidas as estacas do presente trabalho.

Para a cv. Isabel Precoce, até os 28 DAT, nenhuma gema havia brotado e apenas constataram-se diferenças significativas entre os tratamentos aos 56 DAT. Nesta última avaliação, a maior porcentagem foi verificada para o tratamento EA 3% + OV 1%, atingindo 35% de brotação, que se diferiu estatisticamente dos tratamentos-testemunha

(12,5%), OV 1% (17,5%) e EA 3% (15,0%) (Figura 1). Esta cultivar, por ser mais precoce e apresentar menor exigência em frio hibernal, possivelmente se encontrava em um estágio de endodormência menos profunda após 90 horas de frio, comparada à cv. Cabernet Sauvignon por ocasião do tratamento, tendo, portanto, maior êxito no estímulo à brotação.

A mistura de óleo vegetal ao extrato de alho propiciou os melhores resultados na brotação de gemas da cv. Isabel Precoce. De acordo com Dokoozlian et al. (1998), as escamas das gemas de videiras, que as protegem da dessecação e das condições climáticas extremas, conferem uma barreira para produtos utilizados para a quebra de dormência. Neste caso, os surfactantes poderiam aumentar a penetração dos produtos na gema, incrementando a sua eficiência.

Há fortes evidências de que um dos principais mecanismos envolvidos na quebra de dormência de plantas frutíferas de clima temperado esteja relacionado à indução pelo estresse oxidativo (Pinto et al., 2007). De acordo com Pinto et al. (2007), o  $H_2O_2$  funcionaria como um sinal químico, ativando diretamente a expressão de genes ou, indiretamente, provocando alterações metabólicas que são detectadas por outras moléculas, como, por exemplo, kinases, que atuariam ou reprimiriam a expressão de genes responsáveis pela saída da dormência. Segundo Pérez & Lira (2005), tanto a aplicação de cianamida hidrogenada como a exposição ao frio inibiram a atividade de catalase, a principal enzima responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na gema de videiras. Além disso, um aumento momentâneo nos níveis de  $H_2O_2$  precedeu a superação da endodormência em gemas de videiras cv. Thompson Seedless.

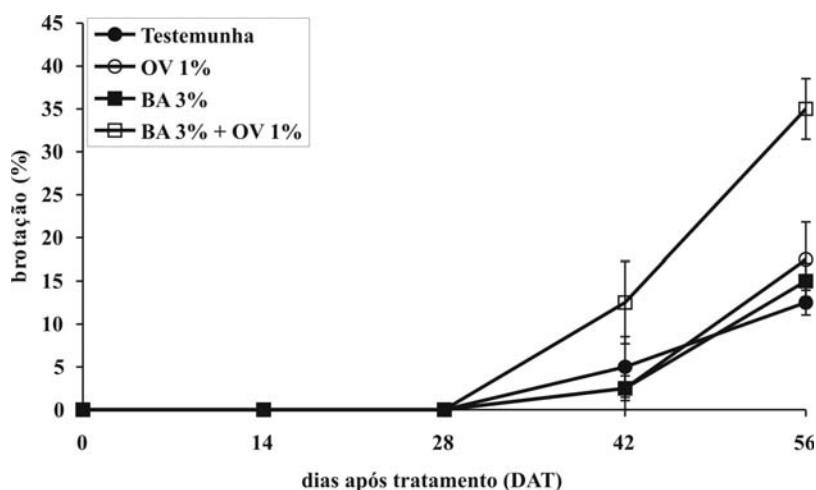
Segundo Kubota et al. (1999), as substâncias ativas no alho, responsáveis pela quebra de dormência em videiras, são compostos voláteis de sulfito com dois grupos alil, particularmente o dialil dissulfito, embora os dialil mono, tri e tetra sulfitos possam também estar envolvidos. Possivelmente, estes compostos atuam pelo mesmo mecanismo proposto por Pinto et al. (2007), na quebra de dormência de plantas frutíferas de clima temperado, ou seja, através do estresse oxidativo, via acúmulo de  $H_2O_2$ . Lemar et al. (2005) observaram que a aplicação de extrato de alho causou um estresse oxidativo em células de *Candida albicans*, mas, neste caso, isto levaria à inibição do crescimento de colônias deste fungo e da desestruturação dos seus componentes celulares.

### **Controle *in vitro* do fungo *Elsinoe ampelina***

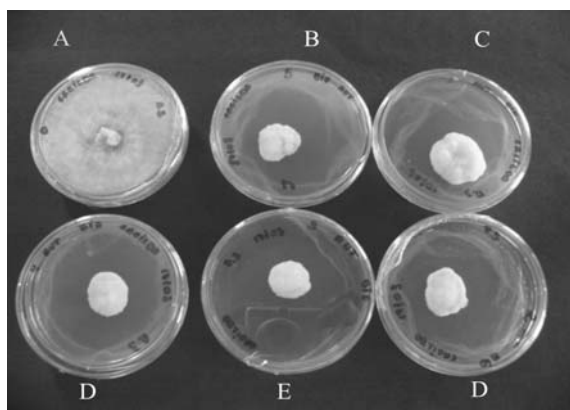
O extrato de alho promoveu a redução do crescimento micelial *in vitro* de *Elsinoe ampelina*, havendo inibição para todas as doses testadas. Nos três experimentos, houve efeito quadrático das doses de extrato de alho e não se verificaram diferenças entre os tratamentos com extrato de alho. No primeiro experimento, a menor dose (EA 0,3%) promoveu a redução de 62,5% no crescimento micelial (Figuras 2 e 3). No segundo, a menor dose (EA 0,15%) reduziu o crescimento em 80,0% (Figura 4), e no último, na dose mais baixa (EA 0,0615%), a redução foi de 67,8% (Figura 5).

Estes resultados confirmam que alguns componentes do alho apresentam propriedades fungicidas. Segundo Lemar et al. (2005), álcool alil e dialil di e trissulfito estão entre as substâncias biocidas mais potentes. Neste caso, a formação de álcool alil em ambiente aquoso resulta da transformação de dialil di e trissulfito. Da mesma forma, O'Gara et al. (2000) observaram efeitos no controle *in vitro* da bactéria *Helicobacter pylori*, utilizando óleo de alho, pó de extrato de alho ou de seus componentes isolados do grupo alil sulfito.

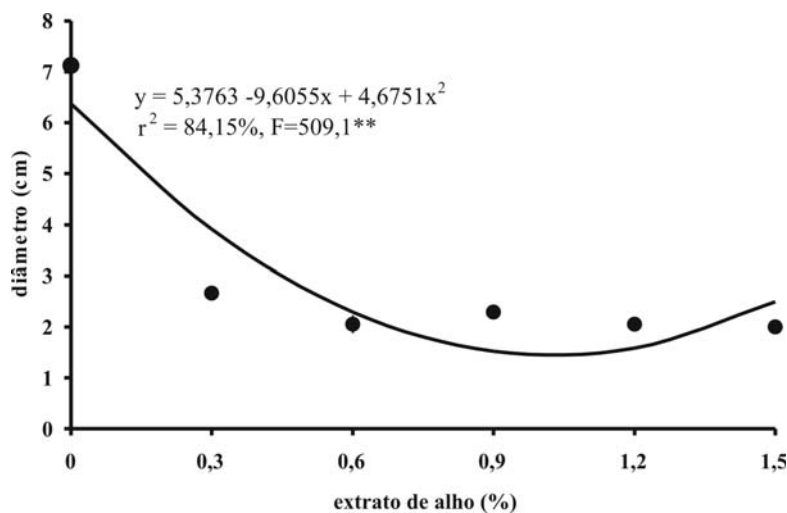
Novos trabalhos devem ser conduzidos a campo para verificar o efeito do extrato de alho na quebra de dormência de videiras em condições menos limitantes do que neste experimento, ou seja, em que as gemas não se encontrem em estágio de endodormência tão profunda. No entanto, ficou evidente a perspectiva de seu uso, principalmente utilizando a mistura com óleo de soja emulsionável. Evidências do efeito fungicida do extrato de alho sobre *E. ampelina* abrem uma perspectiva interessante para o controle de doenças da videira em sistema de produção orgânico de uvas, exigindo maiores estudos, inclusive utilizando doses ainda menores.



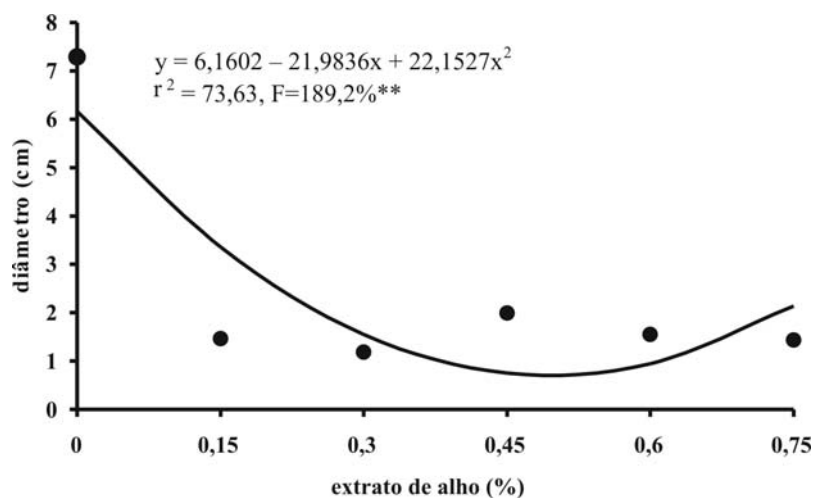
**FIGURA 1-** Percentagem de brotação de gemas de videira cv. Isabel Precoce submetidas a diferentes tratamentos para quebra de dormência (barras verticais representam o desvio-padrão, n = 4).



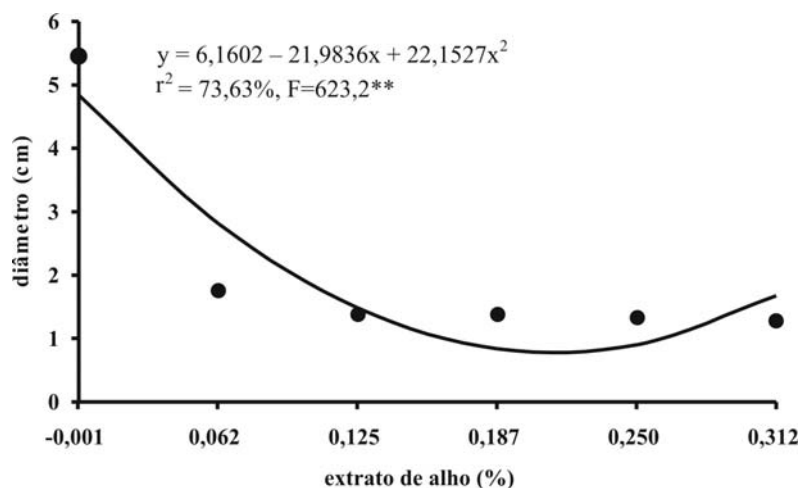
**FIGURA 2 -** Crescimento micelial do fungo *Elsinoe ampelina*, em meio de cultura BDA, com diferentes doses de extrato de alho: A) 0%; B) 0,3%; C) 0,6%; D) 0,9%; E) 1,2% e F) 1,5%.



**FIGURA 3 -** Diâmetro médio de colônia do fungo *Elsinoe ampelina*, em meio BDA, com diferentes doses de extrato de alho, quatro dias após repicagem .



**FIGURA 4** - Diâmetro médio de colônia do fungo *Elsinoe ampelina*, em meio BDA, com diferentes doses de extrato de alho, quatro dias após a repicagem.



**FIGURA 5** - Diâmetro médio de colônia do fungo *Elsinoe ampelina*, em meio BDA, com diferentes doses de extrato de alho, quatro dias após repicagem.

## CONCLUSÕES

1- Extrato de alho a 3% e óleo vegetal a 1% estimularam parcialmente a brotação de gemas de videiras cv. Isabel Precoce, em pulverizações após um acúmulo de 90 horas de frio ( $\leq 7,0^{\circ}\text{C}$ ).

2- Todas as doses de extrato de alho reduziram significativamente o crescimento micelial *in vitro* do fungo *Elsinoe ampelina*, agente causal da antracnose da videira, incluindo a menor dose testada de EA 0,0615%.

## REFERÊNCIAS

BOTELHO, R. V.; PAVANELLO, A. P.; PIRES, E. J. P.; TERRA, M. M.; MULLER, M. M. L. Effects of chilling and garlic extract on bud dormancy release in Cabernet Sauvignon grapevine cuttings. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 58, p.402-404, 2007.

DOKOOZLIAN, N.K. Chilling temperature and duration interact on the budbreak of 'Perlette' grapevine cuttings. **HortScience**, Alexandria, v.34, n.6, p.1054-1056, 1999.

- DOKOOZLIAN, N.K.; EBISUDA, N.C.; NEJA, R.A. Surfactants improve the response of grapevines to hydrogen cyanamide. **HortScience**, Alexandria, v.33, n.4, p. 857-859, 1998.
- GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SÔNEGO, O.R. **Principais doenças fúngicas da videira no Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPACNPV, 1993. 36 p. (Circular Técnica, 17).
- KUBOTA, N.; MATTHEWS, M.A.; TAKAHAGI, T.; KLIEWER, W.M. Effect of garlic preparations and of calcium and hydrogen cyanamides on budbreak of grapevines grown in greenhouses. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.51, n.4, p. 409-414, 2000.
- KUBOTA, N.; MIYAMUKI, M. Breaking bud dormancy in grapevines with garlic paste. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.6, p.898-901, 1992.
- KUBOTA, N.; YAMANE, Y.; TORIU, K; KAWAZU, K; HIGUCHI, T.; NISHIMURA, S. Identification of active substances in garlic responsible for breaking bud dormancy in grapevines. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.68, n.6, p.1111-1117, 1999.
- LAVEE, S.; MAY, P. Dormancy of grapevine buds – facts and speculation. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Kyoto, v.3, p.31-46, 1997.
- LEMAR, K.M.; PASSA, O.; AON, M.A.; CORTASSA, S.; MÜLLER, C.T.; PLUMMER, S.; O'ROURKE, B.; LOYD, D. Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produces oxidative in *Candida albicans*. **Microbiology**, Reading, v.151, p.3257-3265, 2005.
- O'GARA, E.A.; D. J. HILL, D.J.; MASLINI, D.J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.5, p. 2269–2273, 2000.
- PÉREZ, F.J.; LIRA, W. Possible role of catalase in post-dormancy bud break in grapevines. **Journal of Plant Physiology**, Gena, v.162, n.3, p.301-308, 2005.
- PINTO, M.; LIRA, V.; UGALDE, H.; PÉREZ, F. **Fisiología de la latencia de las yemas de vid: hipótesis actuales**. Santiago: Universidad de Chile. 16p. Disponível em: <<http://agronomia.uchile.cl/extension/serviciosyproductos/gie/publicaciones>>. Acessado em: 24 dez.2007.
- SETTIMI, L.; DAVANZO, F.; FARAONI, MICELI, G.; RICHMOND, D.; CALVERT, G.M. Update: Hydrogen Cyanamide-related Illnesses-Italy, 2002-2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.54, p.405-408, 2005.
- SÔNEGO, O.R. **Principais doenças fúngicas da videira no Brasil e medidas de controle**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2000. 5p. (Instrução Técnica, 3)
- SÔNEGO, O.R.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; ZARPELON, S.L. **Eficácia de fungicidas no controle da antracnose da videira**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1996. 18p. (Boletim de Pesquisa, 8).