

Eliminação de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em estacas de bambu infestadas artificialmente*

Dulândula Silva Miguel Wruck^{1**}, José Rogério Oliveira², Reginaldo da Silva Romeiro², Onkar dev Dhingra²

¹ EPAMIG, CP 351, 38001-970 – Uberaba, MG. dmiguel@epamiguberaba.com.br; ² UFV - Departamento de Fitopatologia, 36571-000 - Viçosa, MG, dfp@ufv.br

* Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Viçosa. Realizado com auxílio financeiro da FAPEMIG.

** Bolsista da CAPES

Data de chegada: 22/11/2004. Aceito para publicação em: 30/11/2005.

1148

ABSTRACT

Miguel-Wruck, D.S., Oliveira, J. R., Romeiro, R. da S.; Dhingra, O.D. Control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in bamboo stakes used for tomato production. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.4, p.373-375, 2006.

Different treatments were compared as a means to eradicate viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from infested bamboo stakes. The soaking of the stakes, for 30 minutes, in a 2%

solution of sodium hypochlorite was the most efficient treatment, as compared to solarization with or without a plastic mulch and fumigation with phosfine or methyl bromide.

Additional keywords: Copper, sodium hypochlorite, phosfine, methyl bromide, solarization.

RESUMO

Miguel-Wruck, D.S., Oliveira, J. R., Romeiro, R. da S.; Dhingra, O.D. Controle de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. em estacas de bambu infestadas artificialmente. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.4, p.373-375, 2006.

Diferentes tratamentos foram comparados visando a erradicação de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de estacas de bambu infestadas artificialmente. A imersão das estacas, por 30 minutos, em uma

solução de hipoclorito de sódio a 2% foi o tratamento mais eficiente, em comparação à solarização, à exposição direta aos raios solares, à imersão em sulfato de cobre e à fumigação com fosfina ou brometo de metila.

Palavras-chave adicionais: Cobre, Hipoclorito de sódio, fosfina, brometo de metila, solarização.

O cancro bacteriano do tomateiro, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (3), tem sido relatado na maioria das áreas de cultivo de tomate no mundo (2, 7, 14, 18). É uma das doenças mais destrutivas do tomateiro estaqueado, sendo responsável por grandes prejuízos econômicos. A principal forma de disseminação do patógeno, a longas distâncias, é por meio de sementes contaminadas, onde a bactéria pode sobreviver por longos períodos (Bryan, 1930 e Strider, 1969, citados por CHANG et al. (2). Além da sobrevivência em sementes *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pode sobreviver em restos de cultura (2, 6, 7), em hospedeiros alternativos (19, 20, 21, 22), na forma de populações epífitas em plantas não-hospedeiras (2, 6, 7), no solo (1, 18) e em locais não convencionais, como estacas de madeira, bambu e caixas de arame (8, 15). Inóculo dessas fontes pode ser disseminado por respingos de água ou por práticas culturais, tais como o estaqueamento, a desbrota, a amarração e a colheita (7, 13, 18), permitindo assim que *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* infecte plantas de tomate saudáveis.

Os agricultores que cultivam o tomate estaqueado, via de regra reutilizam o espaldeamento - estacas de madeira e bambu - do plantio anterior, quase sempre sem maiores cuidados de desinfestação do mesmo. Segundo GOTO (8), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* tem mostrado capacidade de sobreviver por sete-oito meses, em condições de ar seco, na superfície de estacas de madeira e em caixas de arames. MIGUEL-WRUCK et al. (15) investigaram a importância do inóculo de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* em estacas de bambu e verificaram que a bactéria sobreviveu associada às mesmas por até 100 dias, sendo efetivamente transmitida para plantas de tomate durante esse período. Portanto, a desinfestação do material utilizado no espaldeamento do tomateiro, antes de sua reutilização, é uma medida importante no manejo do cancro bacteriano.

O objetivo do presente estudo foi avaliar diversas formas de tratamento de estacas de bambu, infestadas artificialmente com *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, visando a sua erradicação, de forma a propiciar a reutilização deste material em novos plantios.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e em casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

O isolado de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* T-2074, utilizado neste trabalho, foi obtido de tomateiro var. Cláudia do município de Sabino-SP.

Para a infestação artificial das estacas, uma suspensão de células bacterianas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* foi preparada em solução salina (NaCl 0,85%). A concentração das células bacterianas foi ajustada por colorimetria ($OD_{540} = 0,1$), conforme utilizado por OLIVEIRA & ROMEIRO (16).

O processo de infestação consistiu na imersão de 12 estacas de bambu de 70 cm de comprimento, na suspensão bacteriana, por 24 horas. As estacas foram, então, postas para secar, à temperatura ambiente. Para confirmar a eficiência da infestação artificial das estacas de bambu, procedeu-se à avaliação de duas amostras, sendo uma infestada e outra não-infestada, conforme metodologia utilizada por MIGUEL-WRUCK et al. (15), onde cada amostra foi constituída por três estacas, que foram fragmentadas e colocadas em frascos erlenmeyers, contendo 350 mL de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada sob agitação constante e a frio, durante 4 horas, procedendo-se, assim, à extração.

Após a extração, as suspensões obtidas foram concentradas por centrifugação a 10.000 G por 15 minutos (12). O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de solução salina e dividido em duas alíquotas. A primeira foi inoculada em plantas de tomate, por meio de injeção (13). A segunda alíquota sofreu enriquecimento com 50 mL do meio semi-seletivo líquido. O meio ficou sob agitação constante em banho-maria, a 28°C, por 24 horas, de forma a permitir a multiplicação da bactéria. Procedeu-se, então, a uma nova centrifugação a 10.000 G, por 15 minutos, e o sedimento resultante foi ressuspenso em solução salina e inoculado em plantas de tomate, por meio de injeção. Após o aparecimento dos sintomas foi realizado o teste de exsudação em gota (5) e, nas plantas que apresentaram exsudação positiva, o agente causal foi isolado em meio 523, para comprovar a identidade da bactéria.

Os tratamentos utilizados, visando a erradicação de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, foram:

€ Tratamento I - Solarização (4, 10, 11): uma amostra de estacas infestadas com *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* foi colocada sobre um plástico preto e, posteriormente, coberta por um plástico de polietileno transparente, tendo suas bordas sobrepostas e fixadas ao plástico preto por meio da deposição de solo. A avaliação foi realizada aos 30 dias após o início do tratamento.

€ Tratamento II - Exposição direta aos raios solares: a amostra de estacas infestadas foi colocada sobre um plástico preto e exposta diretamente aos raios solares. A avaliação foi feita após 30 dias de tratamento.

€ Tratamento III - Imersão em hipoclorito de sódio a 2% (17): a amostra de estacas infestadas foi imersa na solução de NaClO 2%, por 30 minutos, após o que as estacas foram secas ao ar, por 48 horas, seguindo-se a avaliação.

€ Tratamento IV - Fumigação com fosfina: numa caixa de amianto de 100 L, contendo um tablete de 3g de fosfeto de alumínio (Gastoxim™), foi introduzida uma amostra de estacas infestadas. As estacas ficaram expostas ao fosfeto de alumínio dentro de uma caixa fechada, por 72 horas realizando-se, a seguir, a avaliação.

€ Tratamento V - Fumigação com brometo de metila: numa caixa de amianto de 100 L foi introduzida uma amostra de estacas infestadas,

para o tratamento com 8 cm³ de brometo de metila (Brometila™), por 48 horas, sendo a avaliação realizada a seguir.

€ Tratamento VI - Imersão em sulfato de cobre: uma amostra de estacas infestadas foi imersa numa solução de sulfato de cobre, na concentração final de 3.500 mg.L⁻¹. O período de imersão foi de 30 minutos, após o qual as estacas foram secas ao ar, por 48 horas, ocorrendo, em seguida, a avaliação do tratamento.

€ Tratamento VII - Controle negativo: constituído de autoclavagem a 121°C, por 20 minutos: para este controle negativo, uma amostra de 5 estacas infestadas foi enrolada em duas folhas de papel jornal, procedendo-se à autoclavagem. Após a secagem das estacas ao ar, por 48 horas, seguiu-se a avaliação.

€ Tratamento VIII - Controle positivo: constituído de uma amostra de estacas infestadas que não sofreram qualquer tratamento.

A avaliação da eficiência dos tratamentos, para erradicação de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* das estacas infestadas, consistiu da extração e confirmação da identidade da bactéria, conforme preconizado por MIGUEL-WRUCK et al. (15) repetindo-se o mesmo procedimento para o tratamento mais promissor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos por solarização e exposição direta aos raios solares, cujas avaliações foram feitas 30 dias após a infestação das estacas de bambu, não foram eficientes para a erradicação de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (INSERIR Tabela 1). A ineficiência destes tratamentos pode estar relacionada tanto à época quanto ao período de exposição das estacas. Realizou-se estes tratamentos no inverno, num período de baixa insolação. No verão, quando a taxa de insolação é mais elevada, poderia se obter sucesso na erradicação da bactéria com estes tratamentos. Novos estudos devem ser realizados para verificar esta hipótese.

Os tratamentos das estacas com hipoclorito de sódio a 2%, fosfina ou brometo de metila mostraram-se eficientes no controle da bactéria (Tabela 1). Os resultados mostram que estes tratamentos, apesar de não erradicarem a bactéria, reduziram a sua população a níveis muito baixos. A intenção inicial nestes tratamentos era de quantificar a redução da população de bactéria em relação ao inoculo inicial, porém a recuperação do patógeno só foi possível utilizando-se técnicas de enriquecimento da solução extratora, para permitir a multiplicação do mesmo.

Dentre os produtos testados, a utilização de hipoclorito de sódio a 2% mostrou-se mais viável para o tratamento do material utilizado no espaldeiramento do tomateiro.

Apesar da boa eficiência apresentada pela fosfina e pelo brometo de metila, o tratamento com hipoclorito de sódio apresenta algumas vantagens para utilização no controle de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* em estacas de bambu. As principais vantagens deste produto são: fácil aquisição no mercado, baixo custo, fácil manuseio, baixa toxicidade para o homem e os animais e baixo risco de contaminação ambiental, uma vez que é fotodegradável. Em contrapartida, a fosfina e o brometo de metila apresentam maior custo, difícil manuseio, maior toxicidade para o homem e os animais, além de serem mais poluentes ao meio ambiente. Estas desvantagens são ainda mais acentuadas para o brometo de metila, tanto que seu uso será banido no Brasil a partir de 2006.

Embora a ação do cobre sobre fitobactérias seja relatada por diversos pesquisadores (19, 9), o controle de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* nas estacas de bambu por meio da imersão destas em solução de sulfato de cobre foi ineficiente. A concentração do cobre e o tempo de imersão das estacas na solução podem ter sido insuficientes

Tabela 1. Avaliação de diferentes formas de tratamento para erradicação de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de estacas de bambu infestadas artificialmente

Tratamento	Enriquecimento	Deteção de <i>Cmm</i>
Solarização	com	+
	sem	+
Sol direto	com	+
	sem	+
Hipoclorito de sódio a 2 %	com	+
	sem	-
Fosfina	com	+
	sem	-
Brometo de metila	com	+
	sem	-
Sulfato de cobre	com	+
	sem	+
Autoclavagem	com	-
	sem	-
Controle positivo	com	+
	sem	+

para destruir o inóculo bacteriano. Assim, novas relações entre esses fatores deverão ser testadas, na tentativa de se obter melhores resultados. Cabe ressaltar, entretanto, que o cobre, pertencendo ao grupo dos metais pesados, apesar de ter baixa toxicidade para mamíferos, apresenta grande capacidade de se acumular no meio ambiente, sendo, por isto, considerado um potencial poluente.

Nas plantas de tomateiro que foram conduzidas nas estruturas construídas com as estacas infestadas, após a exposição da simulação de vento e chuva, foram observadas lesões foliares resultantes da injúria mecânica, essas lesões, após 10 dias, apresentaram resultado positivo para o teste de exsudação em gota. Realizado o isolamento e a confirmação da identidade da bactéria, comprovou-se a presença de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Nas folhas das plantas de tomate conduzidas nas estruturas construídas com as estacas infestadas e tratadas com hipoclorito de sódio a 2%, não se observou a ocorrência de lesões, apenas pequenas injúrias foram verificadas, provavelmente ocasionadas pelo manuseio, porém não foi detectada a presença de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* nessas folhas.

Para confirmação dos resultados, procedeu-se a uma repetição desse tratamento, obtendo-se os mesmos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BASU, P.K. Temperature, an important factor determining survival of *Corynebacterium michiganense* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.60, p.825-827, 1970.
2. CHANG, R.J.; RIES, S.M.; PATAKY, J.K. Local sources of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.553-560, 1992.
3. DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.Jr; VIDAVER, A.K., et al. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 34, p.107-117, 1984.
4. DeVAY, J.E.; STAPETON, J.J.; ELMORE, C.L. **Soil solarization**, Rome: FAO, 1991. 396p.
5. FAHY, P.C.; PERSLEY, G.L. **Plant bacteria diseases: a diagnostic guide**, Sidney: Academic Press, 1983. 393p.
6. FARLEY, J. D.; MILLER, T. D. Spread and control of *Corynebacterium michiganense* in tomato transplants during clipping. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.57, p.767-769, 1973.
7. GLEASON, M.L.; GITAITIS, R.D.; RICKER, M.D. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, p.1069-1076, 1993.
8. GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 342p.
9. JONES, J.B.; WOLTZ, S.S.; JONES, J.P.; PORTIER, K.L. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p.714-719, 1991.
10. KATAN, J. Solar pasteurization of soils for disease control status and prospects. **Plant Disease**, St. Paul, v.64, p.450-454, 1980.
11. KATAN, J.; GRINSTEIN, A.; GREENBERGER, A.; YARDEN, O.; DeVAY, J.E. The first decade (1976-1986) of soil solarization (solar heating): a chronological bibliography. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 15, p.229-255, 1987.
12. KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. **Methods in phyto bacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568p.
13. KIRÁLY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOSSY, F. **Methods in plant pathology with special reference to breeding for disease resistance**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1970. 509p.
14. LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 67p.
15. MIGUEL-WRUCK, D.S.; OLIVEIRA, J.R.; ROMEIRO, R. da S.; DHINGRA, O. D. Sobrevivência e transmissão de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em estacas de bambu infestadas artificialmente para plantas de tomate. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.27, p.283-287, 2001.
16. OLIVEIRA, J.R.; ROMEIRO, R.S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonas cichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, p.355-356, 1990.
17. SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 2.ed. St. Paul: APS, 1988. 164p.
18. STRIDER, D.L. Survival studies with the tomato bacterial canker organism. **Phytopathology**, St. Paul, v.57, p.1067-1071, 1967.
19. STALL, R.E.; ECHENIQUE, BIC.; MARCÓ, G.M. Accion del cobre como bactericida. In ROSSETTI, V.; FEICHTENBERGER, E.; SILVEIRA, M.L. **Cancro cítrico** (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*). São Paulo: Instituto Biológico, 1982. 230p. Bibliografia Analítica.
20. THYR, B.D. *Corynebacterium michiganense* isolated from naturally infected *Solanum triflorum*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.55, p.336-337, 1971.
21. THYR, B.D.; SAMUEL, M. J.; BROWN, P.G. New solanaceous host records for *Corynebacterium michiganense*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.59, p.595-598, 1975.
22. VOLCANI, Z.; ZUTRA, D.; COHN, R. A new leaf and fruit spot disease of pepper caused by *Corynebacterium michiganense*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.54, p.804-806, 1970.