

**UNIOESTE - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**NÍVEL MESTRADO**

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE CÚRCUMA (*Curcuma longa* L.)**  
**EM *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***

**ODAIR JOSÉ KUHN**

Marechal Cândido Rondon  
Paraná – Brasil  
Fevereiro/2003

**ODAIR JOSÉ KUHN**

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE CÚRCUMA (*Curcuma longa* L.)  
EM *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***

Dissertação de Mestrado apresentado à  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná, como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Agronomia – Nível Mestrado.

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ RENATO  
STANGARLIN

Marechal Cândido Rondon  
Paraná – Brasil  
Fevereiro/2003

Ao Pai Eterno, que amou o mundo de tal maneira que deu seu Filho Unigênito para que todo aquele que nele crer não pereça, mas tenha a vida eterna, e, a Jesus Cristo, o Filho do Deus vivo, que me deu a graça de completar esta caminhada na Sua presença. A Ele toda honra, toda glória e todo louvor pelos séculos dos séculos, amém.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A meu Senhor Jesus que me deu esta oportunidade;

A minha esposa que não mediu esforços, como auxiliadora nas minhas horas de necessidade;

A meus pais Enio José Kuhn e Celivia Kuhn, pelo apoio nas horas de decisão;

Ao meu companheiro de luta Roberto Luis Portz, pelas valiosas contribuições, esforço e dedicação a este trabalho;

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin, pela paciência e orientação para a conclusão deste trabalho;

Ao professor Dr. Ricardo Montalván Del Águila, pela idéia e orientação no início do curso;

Aos colegas Odair Johanns, Rubens Fey e Alfredo de Gouvêa, pelo apoio em momentos de precisão;

A Sigmar Herpich, Arthur Bernardes Cecílio Filho, Tiago dos Santos Sousa, Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada e Maria Eugenia S. Cruz, pela provisão do material de estudo;

Ao professor Dr. Mario César Lopes, pela colaboração mediante excelente trabalho realizado no Núcleo de Estações Experimentais da Unioeste, *Campus* de Marechal Cândido Rondon.

A CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pela concessão de bolsa auxílio, e,

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. A CULTURA DA MANDIOCA.....	3
2.2. MURCHA BACTERIANA.....	4
2.2.1. Disseminação.....	5
2.2.2. Controle Convencional .....	6
2.3. CONTROLE ALTERNATIVO.....	7
2.4. CÚRCUMA .....	10
2.5. EXTRATO DE RIZOMAS DE CÚRCUMA PARA CONTROLE DE FITOPATÓGENOS .....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1. OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DA BACTÉRIA.....	16
3.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PATOGÊNICA DO ISOLADO BACTERIANO .....	17
3.2.1. Reação de Hipersensibilidade em Fumo.....	17

3.2.2. Teste Para a Hidrólise do Amido .....	17
3.2.3. Reprodução de Sintomas da Doença.....	18
3.3. CULTIVO E MANUTENÇÃO DO ISOLADO BACTERIANO.....	18
3.4. OBTENÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO .....	18
3.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE CÚRCUMA.....	19
3.6. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE CÚRCUMA.....	21
3.7. TRATAMENTO DE MANIVAS DE MANDIOCA COM EXTRATO DE CÚRCUMA.....	21
3.7.1. Plantio em Solo Esterilizado.....	22
3.7.2. Plantio a Campo Para Avaliação da Produtividade e Severidade .....	23
3.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PATOGÊNICA DO ISOLADO BACTERIANO.....	25
4.2. AÇÃO ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> .....	25
4.3. AÇÃO TERAPÊUTICA <i>IN VIVO</i> .....	28
4.3.1. Plantio em Solo Esterilizado.....	28
4.3.2. Plantio a Campo.....	29
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>33</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Planta de cúrcuma ( <i>C. longa</i> ). No detalhe seus rizomas. ....	20
<b>Figura 2</b>	Extratos de rizomas de <i>C. longa</i> (cúrcuma) provenientes de Maringá (Mar) e Mercedes (Mer) na concentração de 1%.....	20
<b>Figura 3</b>	Tratamento das manivas de mandioca por imersão, de metade do seu comprimento, na solução tratamento. No detalhe, presença de pus bacteriano na maniva. ....	22
<b>Figura 4</b>	Curva de concentração de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (em unidades formadoras de colônias – UFC) em função da absorbância a 580 nm. ....	26
<b>Figura 5</b>	Efeito do extrato aquoso de rizomas de quatro genótipos de <i>C. longa</i> sobre o crescimento <i>in vitro</i> de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> . Crescimento expresso em unidades formadoras de colônias (UFC). ....	26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Crescimento de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> , expresso em unidades formadoras de colônias ( $10^6$ UFC.mL <sup>-1</sup> ), em presença de diferentes concentrações do extrato bruto aquoso de quatro genótipos de <i>C. longa</i> (cúrcuma). .....	27
<b>Tabela 2</b>	Percentual de plantas na emergência e 90 dias após a emergência e presença de sintomas em função do tratamento de manivas de mandioca, infectadas com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> , com extrato aquoso de quatro genótipos de <i>C. longa</i> (cúrcuma). .....	28
<b>Tabela 3</b>	Percentual de plantas de mandioca infectadas com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> tratadas com extrato aquoso de rizomas de <i>C. longa</i> (cúrcuma). .....	29
<b>Tabela 4</b>	Porcentagem de plantas de mandioca em diferentes dias após a emergência a partir de manivas infectadas com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> e tratadas com extrato de rizomas de <i>C. longa</i> (cúrcuma). .....	30
<b>Tabela 5</b>	Produtividade da mandioca em função do tratamento de manivas infectadas com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> , com antibiótico e extrato aquoso de rizomas de <i>C. longa</i> (cúrcuma). .....	31

## RESUMO

A Bacteriose da mandioca causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* é considerada a doença de maior importância para a cultura e está distribuída por todos os locais onde esta é cultivada. Manivas infectadas se constituem na principal forma de disseminação da bactéria para novas áreas de cultivo. O controle químico de fitobactérias é difícil devido à escassez de produtos, bem como, os existentes são usados exclusivamente em culturas de alto valor econômico. Por outro lado, o controle alternativo de doenças de plantas mostra-se promissor, com a descoberta de muitos compostos secundários de plantas medicinais que apresentam atividade antimicrobiana. Nesse contexto, a cúrcuma *Curcuma longa* (Zingiberaceae) planta originária do sudeste da Ásia, apresenta em seus rizomas compostos que possuem ação antimicrobiana que podem ser utilizados no controle de doenças bacterianas em plantas. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do uso de extrato aquoso de quatro genótipos de cúrcuma em *X. axonopodis* pv. *manihotis* *in vitro* provenientes de cultivos de Jaboticabal-SP, Mara Rosa-GO, Maringá-PR e Mercedes-PR e também, verificar o efeito curativo, através do tratamento de manivas de mandioca infectadas com o patógeno, em plantio em solo esterilizado e em condições de campo. No ensaio *in vitro* foram utilizados extratos aquosos dos quatro genótipos de cúrcuma nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20%, enquanto que *in vivo*, apenas nas concentrações de 1 e 10% para os genótipos de Maringá e Mercedes. Água

destilada e antibiótico ( $22,5 \text{ mg L}^{-1}$  de oxitetraciclina +  $225 \text{ mg L}^{-1}$  de estreptomicina) foram os tratamentos controle negativo e positivo, respectivamente. As manivas (com 12 cm de comprimento) foram tratadas por imersão parcial (1/2 do seu comprimento) durante 72 h ( $\pm 28 \text{ }^\circ\text{C}$  – condição de laboratório) em cada solução. Foram utilizadas três manivas por tratamentos para o plantio em solo estéril e 36 para plantio em campo, com cinco e quatro repetições, respectivamente. No experimento *in vitro* o extrato de cúrcuma impediu completamente o crescimento da bactéria na concentração de 10% para o material proveniente de Mercedes, enquanto que para a cúrcuma de Jaboticabal houve controle total a 15% e de Mara Rosa a 20%. O tratamento químico com antibiótico, embora tenha reduzido a população, não inibiu completamente o crescimento bacteriano na dosagem utilizada. A cúrcuma proveniente de Maringá, embora apresente a tendência de controle, não inibiu completamente o crescimento em nenhuma das concentrações testadas. Já no experimento *in vivo*, tanto em solo esterilizado como em campo, as brotações foram extremamente baixas, dado ao grau de infecção das manivas. O extrato bruto de cúrcuma a 10% proveniente de Mercedes, embora apresentasse efeito *in vitro* contra *X. axonopodis* pv. *manihotis*, comportou-se como prejudicial para a mandioca em condição de campo, pois houve redução do estande em relação aos tratamentos controle. Possivelmente, houve ação tóxica direta sobre a fisiologia da planta ou indução de suscetibilidade. Já na concentração de 1% da cúrcuma proveniente de Maringá, não houve diferença estatística em relação as testemunhas para o parâmetro estande de plantas. O controle químico utilizado não foi eficiente, uma vez que comportou-se igual a testemunha água. Com relação a severidade e produtividade não se observou diferenças significativas entre os tratamentos. Os resultados indicam que, embora apresentem atividade antibacteriana a *X. axonopodis* pv. *manihotis*, os extratos de cúrcuma, nas concentrações utilizadas, não apresentam efeito curativo em manivas de mandioca infectadas com o patógeno.

## ABSTRACT

### **Effect of aqueous extract from turmeric (*Curcuma longa* L.) in *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.**

The cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* is the most importance disease of the culture and it is distributed in all the places where it is cultivated. Infected stems constitute themselves in the principal way of the bacterium dissemination to new cultivation areas. The chemical control of phyto-bacteria is difficult due to the products shortage, as well as, the existing ones are used exclusively in plantations of high economic value. By the other hand, the alternative control of the plants diseases is promising, with the discovery of many secondary compounds of medicinal plants that present antimicrobial activity. In this context, the turmeric (*Curcuma longa* - Zingiberaceae) native plant from the southeast of Asia, presents rhizomes that have compounds with an antimicrobial action that can be used in the control of bacterial diseases in plants. In this way, the objectives of this study were to evaluate the effect of using of aqueous extract of four turmeric genotypes in *X. axonopodis* pv. *manihotis* *in vitro* proceeding from Jaboticabal-SP, Mara Rosa-GO, Maringá-PR and Mercedes-PR, and verify the curative effect through the treatment of the infected stems of cassava with the pathogen and plantation in sterilized soil and in field conditions. In the experiment *in vitro* aqueous extracts from the four genotypes of curcuma were used in concentrations of 1, 5, 10, 15 and 20%, while *in vivo* only in the concentrations of 1 and 10% for the genotypes of Maringá and Mercedes. Distilled water and antibiotic (22.5 mg L<sup>-1</sup> of oxytetracycline + 225 mg L<sup>-1</sup> of streptomycin) were the negative and positive control treatments, respectively. The stems (12 cm long) were treated by partial immersion (1/2 of its length) during 72 hours ( $\pm$  28 °C) in each solution. Three

stems for treatment were used for the plantation in sterile soil with five repetitions and 36 in field with four repetitions. In the *in vitro* experiment the curcuma extract inhibited completely the bacterium growth in the concentration of 10% for the material proceeding from Mercedes, while for the Jaboticabal curcuma there was a total control at 15% and for Mara Rosa at 20%. Although the chemical treatment with antibiotic has reduced the population, it hasn't completely inhibited the bacterial growth in the used dosage. Though the curcuma proceeding from Maringá presents the control trend, it did not inhibited completely the growth in any of the experiment concentrations. But in the *in vivo* experiment, as well in sterilized soil as in field, the sproutings were extremely low, due to the stems infection degree. The curcuma raw extract at 10% proceeding from Mercedes, although presented *in vitro* effect against *X. axonopodis* pv. *manihotis*, behaved as harmful to the cassava in field condition, thus there was a stand reduction in relation to the control treatments. Possibly there was a direct toxic action on the plant physiology or susceptibility induction. But in the 1% concentration of the curcuma proceeding from Maringá, there was not statistical difference in relation to witnesses to the plants stand parameter. The used chemical control was not efficient, once it behaved the same as the water witness. In relation to the severity and productivity it was not observed significative differences among the treatments. The results indicate that, while presenting antibacterial activity to *X. axonopodis* pv. *manihotis*, the curcuma extracts, in the used concentrations, they do not present curative effects in cassava stems infected with the pathogen.

## 1. INTRODUÇÃO

A mandioca é uma cultura originária da América, sendo o Brasil um dos principais centros de diversidade genética e também um dos principais produtores mundiais, responsável por 12,6% dos 178,6 milhões de toneladas produzidas no mundo (Groxko, 2002). A grande maioria da mandioca produzida no mundo, cerca de 85%, se destina para o consumo in natura e o restante para a industrialização, tornando-se uma cultura de extrema importância na agricultura familiar (Miura e Monteiro, 1997). Neste contexto, insere-se a Região Oeste do Paraná, que é formada principalmente por pequenas propriedades agrícolas, onde esta cultura encontra-se sempre presente, seja para industrialização, para consumo animal ou humano.

Muitas são as doenças da mandioca, porém, poucas com o poder devastador que tem a bacteriose, também conhecida por murcha bacteriana. Esta doença é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, a qual coloniza os vasos do xilema, de onde retira o seu alimento. A doença se espalhou para todas as regiões produtoras de mandioca do mundo, principalmente por causa do modo de propagação desta, que é realizado através do uso de partes vegetativas dos caules das plantas, as manivas, as quais, quando contaminadas, carregam o patógeno em seu interior.

Poucas são as formas de controle da bacteriose uma vez que desde a década de cinquenta até os dias de hoje os bactericidas são praticamente os

mesmos, somente utilizados em culturas de alto valor econômico. O controle mais eficaz tem sido o uso de manivas sadias (Massola Junior & Bebendo, 1997), o que é difícil para os agricultores, uma vez que praticamente todas as regiões produtoras apresentam lavouras com sintomas da doença (Miura e Monteiro, 1997). O uso de variedades resistentes é outra alternativa, porém a maioria das variedades resistentes são destinadas à indústria. Mas para o consumo humano e animal, usa-se variedades de mesa suscetíveis a bacteriose. Dessa forma, a inexistência de controle econômico e eficaz da bacteriose na mandioca (Lopes, 1998), coloca o produtor na dependência de novas alternativas.

Nos últimos anos, pesquisadores têm se dedicado ao estudo do controle alternativo de doenças de plantas, o qual usa desde microrganismos antagônicos, até espécies de plantas medicinais, que apresentam a partir do seu metabolismo secundário, a produção de moléculas químicas que atuam de forma tóxica a uma diversidade de microrganismos, inclusive fitopatogênicos. Algumas substâncias podem agir de forma tóxica aos microrganismos, porém outras, denominadas eliciadores, podem agir induzindo defesa natural da própria planta contra determinados patógenos, que quando atacam são facilmente vencidos por esta.

O uso do extrato bruto dos rizomas de cúrcuma para a obtenção de manivas de mandioca livres da bacteriose pode ser uma alternativa atraente, visto que é econômica e prática, podendo ser aplicada facilmente pelos pequenos produtores.

O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito bactericida sobre *X. axonopodis* pv. *manihotis* *in vitro* e o controle da murcha bacteriana da mandioca mediante o tratamento de manivas com extrato aquoso de rizomas de quatro genótipos de cúrcuma.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A CULTURA DA MANDIOCA

A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), com produção mundial de 178,6 milhões de toneladas (Groxko, 2002), é utilizada principalmente no consumo *in natura*, o que representa 85% desta produção, sendo os 15% restantes destinados a industrialização para produção de fécula, farinha, raspas e modificados do amido, que nos últimos anos têm tomado espaço no mercado (Miura e Monteiro, 1997).

Esta espécie é originária da América Latina e vem sendo cultivada a mais de 5.000 anos pelos povos nativos. Porém, pouco antes do ano 1600, exploradores europeus levaram a mandioca até o Congo Africano e em seguida até a África Oriental e Ásia, sendo que no final do século XIX já era cultivada em todo o mundo tropical (Miura e Monteiro, 1997).

A mandioca é uma planta do tipo arbusto perene, resistente à seca, com raízes tuberosas (que acumulam amido) de formato variado e em número de 5 a 20. O caule (sem ramificação no período vegetativo) é ereto, de cor cinza ou prateada ou pardo-amarelada. As folhas são simples, com 5 a 7 lóbulos, as flores são unissexuadas masculinas ou femininas e o fruto é uma cápsula com 3 sementes e que se abre quando seco (Bahia, 2001). Embora a mandioca apresente sementes viáveis, elas são utilizadas apenas para a produção de novos cultivares no

melhoramento genético, sendo a propagação feita por estacas (manivas). Por ser propagada vegetativamente, uma série de doenças podem estar sendo levadas juntamente com o órgão propagativo.

## 2.2. MURCHA BACTERIANA

No Brasil são conhecidos cerca de 20 patógenos que afetam a cultura da mandioca, e entre eles estão incluídos fungos, bactérias, vírus, nematóides e protozoários. Entretanto, nas plantações tradicionais de subsistência que predominam no Brasil, poucas são as doenças que podem causar grandes prejuízos aos agricultores (Poltronieri & Trindade, 1999).

A Bacteriose da mandioca ou Murcha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Bondar, 1915) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, 1995, é considerada a doença de maior importância para a cultura. Este patógeno foi inicialmente denominado de *Bacillus manihotis* Arthaud-Berthet (Miura e Monteiro, 1997; Massola Junior & Bedendo, 1997) e identificado no Brasil em 1912 por Bondar (Miura e Monteiro, 1997). Mais tarde, a bactéria foi chamada de *Phythomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Viegas e posteriormente incluído no gênero *Xanthomonas* como *X. manihotis* (Arthaud-Berthet) Star, o qual permaneceu por muito tempo. Em 1974, com a publicação da oitava edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, a bactéria passou a ser considerada como um patovar de *X. campestris*, variando apenas pela especificidade a hospedeiros de gênero *Manihot*, recebendo o nome de *X. campestris* pv. *manihotis* (Berthet & Bondar) (Massola Junior & Bedendo, 1997). Porém, em 1996 com a publicação da *Review of Plant Pathology* foi proposta a divisão da espécie *X. campestris*, sendo dividida em duas espécies, de tal forma que uma parte dos patovares permaneceu como *X. campestris* e outra parte tornou-se *X. axonopodis*, sendo que esta bactéria passou a chamar-se *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Young et al., 1996).

A célula bacteriana da *X. axonopodis* pv. *manihotis* possui o formato de bastonete fino com 0,5 x 0,2 micra, é gram-negativa, movimenta-se por um flagelo polar (monótrica), possui células não encapsuladas e não formadoras de esporos, é aeróbica, com rápido crescimento, sem formar pigmentos em meios com açúcares, não induz reação de hipersensibilidade em folhas de fumo e não causa podridão em tubérculos de batata ou raízes de mandioca (Miura & Monteiro, 1997; Massola Junior

& Bedendo, 1997). Além disso, não fermenta a glicose, não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, mostra reação negativa no teste da oxidase de Kovacs (Massola Junior & Bedendo, 1997) e positivo para o teste de hidrólise de amido (Amaral, 1958; Lozano e Sequeira, 1974a).

Observam-se duas formas sintomatológicas distintas em plantas de mandioca afetadas pela murcha bacteriana: a forma sistêmica ocorre quando a bactéria atinge os tecidos vasculares e a forma não sistêmica ou localizada, quando há somente infecção dos tecidos foliares, sendo a forma sistêmica que causa os maiores danos (Miura & Monteiro, 1997).

O sintoma primário decorrente do plantio de material vegetativo contaminado traduz-se por murcha de folhas novas, seguido da morte das plantas. Os sintomas secundários, provenientes de infecções locais no campo, inicialmente aparecem como pequenas lesões encharcadas e poligonais nas folhas, tornam-se irregulares e podem cobrir grandes extensões, sendo que nesta fase a bactéria é translocada para o pecíolo e haste através do xilema, iniciando uma ação sistêmica na planta, demonstrando sintomas como exudação do látex nas hastes infectadas e morte descendente (Massola Junior & Bedendo, 1997).

### 2.2.1. Disseminação

A murcha bacteriana é disseminada a longas distâncias, principalmente por material propagativo (manivas) infectado (Lozano & Sequeira 1974b). Como não há um rigoroso controle do trânsito de materiais vegetais dentro do território nacional, as manivas infectadas quase sempre são responsáveis pela introdução em áreas isentas do patógeno (Massola Junior & Bedendo, 1997).

A chuva também desempenha um papel importante na disseminação da doença, pois os respingos, ao atingirem plantas infectadas, levam grandes quantidades de células bacterianas que, em contato com folhas maduras, penetram através de ferimentos ou aberturas naturais e em presença de alta umidade iniciam uma nova infecção (Miura & Monteiro, 1997). Sementes verdadeiras também podem carregar o patógeno, sendo sua contaminação feita através dos respingos, ou mesmo pela translocação da bactéria pelo xilema até o embrião onde permanece quiescente (Massola Junior & Bedendo, 1997). Porém, a disseminação por semente

não é importante, uma vez que não se usa desse meio de propagação para a mandioca.

O ambiente é favorável para a bactéria quando a temperatura se encontra entre 20 e 24 °C e com alta precipitação pluvial. Em tais casos, a murcha bacteriana pode constituir-se problema sério (Miura & Monteiro, 1997). Quando a temperatura é superior a 30 °C, mesmo com altos índices pluviométricos, a doença não causa danos significativos (Massola Junior & Bedendo, 1997).

A penetração da bactéria no hospedeiro ocorre pelos estômatos ou por ferimentos e é facilitada quando a umidade relativa do ar está entre 90 e 100%. O tempo para penetração é de aproximadamente 6 horas a partir da deposição da célula bacteriana na superfície foliar (Miura & Monteiro, 1997; Massola Junior & Bedendo, 1997).

A sobrevivência do patógeno no solo pode ocorrer em condição de pH entre 6,0 e 6,5 e com baixo teor de matéria orgânica, porém, dificilmente ultrapassa 60 dias (Massola Junior & Bedendo, 1997). Nos restos culturais este período pode estender-se por até seis meses (Miura & Monteiro, 1997; Massola Junior & Bedendo, 1997).

### 2.2.2. Controle Convencional

O controle mais eficiente da bacteriose da mandioca tem sido o uso de variedades resistentes, sendo que estas variedades, mesmo em condições propícias para a bactéria, não sofrem muitos danos, uma vez que a resistência é multigênica e difícil de ser quebrada (Massola Junior & Bedendo, 1997). A maioria das variedades resistentes é para a indústria e não se prestam para o consumo *in natura*, devido ao sabor amargo. Por outro lado, a grande maioria das variedades de mesa é susceptível a esta doença. A eliminação dos restos culturais para redução da fonte de inóculo é uma prática eficiente (Miura & Monteiro, 1997), ou mesmo o pousio ou rotação de culturas para a eliminação natural do patógeno, uma vez que o mesmo possui baixa longevidade no solo.

Quando se usa variedade susceptível, com boas características agronômicas, recomenda-se medidas auxiliares de controle como: plantio de manivas sadias; rotação de culturas ou simples remoção de restos culturais, seguido de aração e pousio por seis meses; uso de ferramentas desinfestadas e restrição ao

movimento de pessoas das áreas afetadas para as áreas saudas; inspeção fitossanitária com erradicação de plantas doentes e se possível, utilizar o sistema de consórcio com outras culturas. Em locais com estação chuvosa definida deve-se plantar no final do período chuvoso, sendo que esta medida tem dado bons resultados (Massola Junior & Bedendo, 1997).

O controle químico de fitobactérias tem sido bem mais difícil em comparação com o controle de fungos causadores de doenças em plantas. Os antibióticos constituem um grupo de agroquímicos de emprego relativamente recente no controle de doenças de plantas (Kimati, 1997). Para fungos, novas moléculas estão sendo desenvolvidas a cada ano. No entanto, o mesmo não ocorre para o controle de bactérias, sendo os bactericidas de hoje os mesmos usados na década de 1950, quando houve sua descoberta como potencial para uso em plantas doentes, como é o caso dos fungicidas a base de cobre, que junto com os antibióticos estreptomicina, tetraciclina e kasugamicina, são as únicas armas químicas disponíveis no Brasil (Lopes, 1998). Outro fator agravante dos bactericidas é a limitação do uso apenas a culturas de alto valor econômico e representando alto risco de prejuízos (Kimati, 1997), revelando a necessidade da busca de formas alternativas de controle.

### 2.3. CONTROLE ALTERNATIVO

Sob a denominação genérica de controle alternativo, estão incluídos o controle biológico e o controle induzido, também conhecido como indução de resistência, resistência induzida e imunização (Moraes, 1992).

O controle biológico pode ser definido como o controle de um microrganismo pela ação direta de outro microrganismo antagônico, o qual pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (Cook & Baker, 1983; Moraes, 1992). Já a indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta aos tratamentos com agentes bióticos ou abióticos (Hammerschmidt & Dann, 1997). Uma diferença fundamental entre o controle biológico e o controle induzido é que, no primeiro, a ação controladora se faz direta e primariamente sobre o patógeno, enquanto que, no segundo, a ação se dá sobre a planta hospedeira, modificando a sua relação com o patógeno (Moraes, 1992).

A indução de resistência pode se dar por mecanismos estruturais como papilas, lignificação e tilose ou bioquímicos, como o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (Pascholati & Leite, 1995).

O termo indução de resistência pode ser utilizado para designar uma proteção local, isto é, a indução de resistência apenas nos tecidos onde foi feito o tratamento com o agente indutor, como pode também indicar uma resistência sistêmica, que se manifesta em outro local diferente daquele onde foi aplicado o indutor (Moraes, 1992). Estes agentes indutores de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de defesa nas plantas são chamados de eliciadores (Smith, 1996), podendo apresentar natureza química variada, tais como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra que não há uma característica estrutural única que determine a atividade elicitora (Stangarlin et al., 1999).

Uma grande quantidade de compostos secundários das plantas medicinais já isolados e com estrutura química determinada, ainda não foi estudada quanto as suas atividades biológicas (Stangarlin et al., 1999). Tais compostos possuem considerável diversidade química, como alcalóides, terpenos, flavonóides, cumarinas, lignanas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas, esteróides, ácidos fenólicos, etileno e várias outras substâncias (Castro et al., 1983; Di Stasi, 1996).

Stangarlin et al. (1999) destacam que trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de composto(s) com características de eliciador (es). Os mesmos autores demonstram ainda que extrato bruto de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), mangerona (*Origanum majorana*), alfavaca (*Ocimum basilicum*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), babosa (*Aloe vera*), mil-folhas (*Achillea millefolium*), orégano (*Origanum vulgare*), cardo santo (*Argemone mexicana*), pitanga (*Stenocalyx michelli*), erva cidreira (*Lippia alba*), poejo (*Mentha pulegium*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*), romã (*Punica granatum*), goiabeira vermelha (*Psidium guaiava* var. *pomifera*), eucalipto lima (*Eucaliptus citriodora*), manjerição (*Ocimum basilium*), arruda (*Ruta graveolens*) e carqueja (*Baccharis trimera*) promoveram a indução da produção de fitoalexinas, caracterizando a atividade elicitora.

Muitos compostos secundários de plantas medicinais também apresentam atividade antimicrobiana, como é o caso dos alcalóides com origem biossintética a partir da via metabólica do ácido chiquímico (Benett & Wallsgrave, 1994). Esta ação antimicrobiana também foi observada por Bastos (1997), utilizando o óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora parasitica*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Sclerotium coffeicolum*, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, *Cylindrocladium scoparium* e *Curvularia eragrostidis*, apresentando acentuada toxicidade, provocando total inibição do crescimento micelial em concentrações variando de 50 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Santos (1998) observou que extrato obtido de erva cidreira (*L. alba*) inibiu a formação de apressórios na germinação de conídios de *Coletotrichum gloesporioides* em condições de laboratório e Stangarlin et al. (1999) também constataram que o extrato bruto de arruda (*R. graveolens*) e manjerição (*O. basilicum*) inibiram totalmente o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* em concentrações acima de 10%, e, nos ensaios com óleo essencial, observaram que em presença de alíquotas de 20 a 1000  $\mu\text{L}$  do óleo, houve 100% de inibição do crescimento micelial dos fungos. Para o óleo de arruda, apenas *Alternaria alternata* apresentou crescimento micelial até a alíquota de 40  $\mu\text{L}$  (inibição de 74%), havendo inibição de 100% no crescimento para as demais alíquotas.

Fiori et al. (2000) estudando a atividade antifúngica de extratos de folhas e óleo essencial de mil folhas (*Achillea millefolium*), capim cidreira (*Cymbopogon citratus*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) e mentrasto (*Ageratum conyzoides*) contra *Didymela bryoniae*, causador do crestamento gomoso do caule em cucurbitáceas, obtiveram inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos. Observações feitas por estes autores com o auxílio de microscópio eletrônico mostrou que na presença de óleo essencial de mil folhas (*A. millefolium*), *D. bryoniae* apresentou hifas mais curtas em comparação com o controle, além de ocorrência de lise da parede celular e extravasamento do citoplasma, ocasionado por componentes presentes neste óleo.

Isto deixa evidente que as substâncias do metabolismo secundário de plantas medicinais são uma vasta fonte de moléculas químicas com potencial para o controle de doenças de plantas.

## 2.4. CÚRCUMA

A cúrcuma é uma planta da família Zingiberaceae, originária do sudeste da Ásia, mais precisamente das encostas dos morros das florestas tropicais da Índia (Cecílio Filho et al., 2000). É também conhecida vulgarmente no Brasil por açafão da Índia, açafão da terra, açafroa, batatinha amarela, gengibre dourada, entre outros. Pode ser cultivada praticamente em locais que apresentam clima tropical e subtropical. A China, Kuwait, Índia, Indonésia e Sri Lanka são os maiores produtores, sendo que a Índia tem as melhores produtividades, atingindo 22 t ha<sup>-1</sup>. No Brasil é mais cultivada em Goiás, Mato Grosso e São Paulo e a produtividade média gira em torno de 8 a 12 t ha<sup>-1</sup> (Pereira & Stringheta, 1998).

A planta é do tipo herbácea e perene, atinge em média 120 a 150 cm de altura em condições favoráveis de clima e solo (Cecílio Filho et al., 2000). É uma planta com caule tipo rizomas de onde partem quatro ou cinco folhas com pecíolos longos e disposição alternada. As folhas são de formato lanceolado, liso, de cor verde pálida, apresentam sulcos oblíquos na face inferior, com 30 a 50 cm de comprimento com 10 a 15 cm de largura. Na parte inferior, a justaposição dos pecíolos forma uma espécie de estipe (Peckolt & Peckolt, 1899<sup>1</sup> apud Curcuma, 2003).

A raiz forma um rizoma grosso, central, arredondado, de onde partem três ou quatro tubérculos laterais de conformação e grossura de um dedo, imitando aparentemente os dedos da mão entreaberta, tendo muitas radículas de 10 a 15 cm de comprimento, finalizando na parte inferior em tubérculos pequenos, esbranquiçados, arredondados e amiláceos (Peckolt & Peckolt, 1899 apud Curcuma, 2003).

Dos rizomas laterais podem brotar outras tantas plantas independentes que podem também viver isoladas da planta originária. Estes rizomas privados da película externa, esbranquiçada ou acinzentadas, são de cor amarela claro a alaranjada e possuem aroma e sabor picante, levemente amargo (Peckolt & Peckolt, 1899 apud Curcuma, 2003).

---

<sup>1</sup> PECKOLT, T & PECKOLT, G. **História das plantas medicinais e úteis do Brasil**. 7<sup>o</sup> facículo – Rio de Janeiro: Cia. Typographica do Brasil, p. 1119-1369, 1899.

As flores são dispostas em espiga de 10 a 15 cm e central, apresentam cor verde, envolvida pela bainha das folhas, compostas de brácteas agudas, imbricadas, esverdeadas e esbranquiçadas ou pardacentas sobre as bordas. O cálice é tubuloso com três divisões, e a corola, também tubulosa, é dividida em três partes. O androceu é formado por dois estames reduzidos a estaminóides bífidos e um terceiro fértil. A antera é bilocular, tendo na base dois esporões e o filete petalóide trilobado. O ovário é ínfero, trilocular, pluri-ovulado, com estilete capilar. O fruto é uma cápsula globosa, trilocular, de deiscência loculicida e com muitas sementes ariladas (Peckolt & Peckolt, 1899 apud Curcuma, 2003).

Os rizomas representam o interesse econômico da cultura, apresentando características como: 12% de proteína, 30 a 50% de amido, 5,5% de fibra e 2 a 9% de cinzas. No entanto, não são os atributos nutritivos os principais componentes qualitativos dos rizomas de cúrcuma, sendo caracterizado e avaliado pela presença do corante curcumina e de óleos essenciais (Cecílio Filho, 1996).

Atualmente, são três os produtos de cúrcuma disponíveis no mercado: o pó de cúrcuma, que consiste em raízes secas e moídas contendo cor e aroma, sendo utilizado em pastas de mostarda e em condimentos, bem como em pratos típicos indianos, árabe e chinês; a oleoresina da cúrcuma, que é obtida por extração com solventes do pó de cúrcuma, com rendimentos de 12%, sendo que este apresenta 30 a 40% de pigmentos expressos em curcumina e de 15 a 25% de óleo volátil, sendo um produto altamente viscoso e de cor marrom alaranjada, (quando se dilui a níveis de uso, torna-se de cor amarela brilhante, com aroma característico da cúrcuma *in natura* e sua função predominante é colorir); e, o terceiro produto é o extrato de curcumina purificado, que se apresenta sem o aroma ou sabor residual (Pereira e Stringheta, 1998).

Utilizada já desde a antiguidade na medicina e gastronomia popular do oriente, a cúrcuma vem se tornando importante para a ciência moderna no combate a vários problemas, podendo-se destacar alguns efeitos de seus componentes como: antiinflamatório, antioxidante, antiprotozoário, antibacteriano, antifúngico e antinematóide.

Atividade antiinflamatória – Araújo e Leon (2001) relatam trabalhos sobre o efeito dos componentes extraídos da cúrcuma no combate a reações inflamatórias

tanto crônicas como agudas. As substâncias identificadas com tal capacidade foram a curcumina e o curcuminato de sódio.

Atividade antioxidante – Lean & Mohamed (1999) demonstraram o efeito da cúrcuma como antioxidante medindo a formação de peróxidos num período de quatro semanas. Araújo e Leon (2001) citam alguns trabalhos que demonstram o efeito de substâncias extraídas da cúrcuma com a capacidade de proteger a hemoglobina da oxidação até mesmo em concentrações tão baixas quanto 0,08 mM. Em outro trabalho citado por estes autores com microsomas de fígado, membranas de eritrócitos e células cerebrais de rato, a curcumina demonstrou ser um bom inibidor da peroxidação de lipídios agindo sobre ânions superóxido e radicais hidroxila que são responsáveis pelo início da peroxidação de lipídios. As principais moléculas que causam este efeito são a curcumina e seus derivados como desmetoxicurcumina e a bis-desmetoxicurcumina.

Atividade antiprotozoário – Araújo et al. (1998 e 1999) estudando a ação de substâncias provenientes de zingiberáceas observaram que a curcumina e a metilcurcumina apresentam uma excelente atividade contra *Leishmania amazonensis*. Rasmussen et al. (2000) relatam que o extrato etanólico de cúrcuma inibiu o crescimento de *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major* em experimento *in vitro*.

Atividade antibacteriana – várias espécies de cúrcuma possuem ação bactericida, em menor ou maior intensidade. Alkofahi et al. (1997) relatam uma fraca ação bactericida do oleoresina de cúrcuma contra *Staphylococcus aureus*. Araújo & Leon (2001) citam a ação bactericida do óleo de cúrcuma em algumas espécies bacterianas. Hwang et al. (2000) sugerem a produção de alimentos e produtos dentais para prevenção de doenças orais, uma vez que o xanthorrhizol proveniente de *Curcuma xanthorrhiza* demonstrou alta atividade bactericida contra patógenos causadores de cáries e periodontites. Buragohain & Dutta (1998) trabalhando com a *C. longa* e Kolte et al. (1999) trabalhando com *C. amada*, obtiveram resultados positivos, até semelhantes a antibiótico, porém mais lentos. Uechi et al. (2000) trabalhando com *C. longa*, *C. aromatica* e *C. zedoaria* demonstraram o efeito bactericida através da medição da zona de inibição no crescimento de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* causado pelos princípios ativos presentes nestas plantas.

Atividade antifúngica – A ação antifúngica pode ser verificada em trabalhos como de Lean & Mohamed (1999) que observaram a inibição do crescimento de bolor em pães com extrato etanólico de cúrcuma. Na medicina humana Apisariyakul et al. (1995) estudando a atividade antifúngica da cúrcuma em fungos causadores de dermatomicoses, obtiveram inibição do crescimento *in vitro* e redução do tamanho de lesão em experimento *in vivo* com cobaias. Sharma & Dwivedi (1990) obtiveram êxito com extrato de várias plantas, entre elas a *C. longa*, no tratamento de dermatomicoses em bovinos e cães.

Atividade antinematóide – Araújo & Leon (2001) citam o trabalho de Kiuchi et al. (1993)<sup>2</sup>, os quais isolaram um novo curcuminóide, a ciclocurcumina, que mostra ação associada com outras substâncias contra nematóides.

Outros trabalhos também relatam que a cúrcuma, quer seja na forma *in natura* ou através de produtos derivados, promove benefícios, como a inibição do vírus da imunodeficiência humana Tipo-1 (Mazumder et al., 1995; Araújo & Leon, 2001); atividade antitumorígena e anticarcinogênica (Ruby et al., 1995; Lin & Lin-Shiau, 2001; Araújo & Leon, 2001); efeito favorável nos níveis de colesterol HDL e atividade antimutagênica (Araújo & Leon, 2001); atividade tóxica e repelente contra insetos (Saju et al., 1998; Chander et al., 2000; Latha & Ammini, 2000) e atividade antihemorágica em problemas de envenenamento ocasionados por ofídios (Araújo & Leon, 2001). Podem ser acrescentados os efeitos conhecidos pela farmacopéia asiática como estomáquico, estimulante, carminativo, expectorante e anti-helmíntico (Cecílio Filho et al., 2000).

As ações acima citadas estão ligadas a uma série de compostos produzidos pela planta, sendo sua maioria produtos do metabolismo secundário. O pigmento curcumina é o principal deles, além de outros pigmentos como a desmetoxicurcumina e a bis-desmetoxicurcumina (Pereira & Stringheta, 1998). Os óleos essenciais são constituídos, principalmente, de tumerona (59%), d-hidroxitumerona e um percentual menor de cetonas aromáticas como: zingibereno (25%), d- $\alpha$ -felondrena (1%), d-sabineno (0,6%), cineol (1%), borneol (0,5%) (Martins & Rusig, 1992),  $\beta$ -cariofileno (0,2%),  $\beta$ -farneseno (0,2%),  $\alpha$ -curcumeno (1,4%),  $\beta$ -

---

<sup>2</sup> KIUCHI F., GOTO, Y.; SUGIMOTO, N.; AKAO, N.; KONDO, K. e TSUDA, Y. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. Chem. Pharm. Bulletin, v. 41 p.640-1643, 1993.

curcumeno (2,5%),  $\beta$ -sesquifelandreno (2,4%),  $\beta$ -bisabolol (0,3%),  $\alpha$ -tumerol (0,9%), curcufenol (0,6%),  $\alpha$ -atlantona e traços de  $\alpha$ -felandrena, p-cimeno, limoneno, 1,8 cineol, canfor,  $\beta$ -elemeno e germacrona (Zwaving & Bos, 1992).

O conteúdo dos componentes varia em função do genótipo, local de plantio, práticas agrícolas, uso de fertilizantes e maturidade dos rizomas (Pereira & Stringheta, 1998). Para diferentes condições, a cúrcuma pode apresentar variação nas concentrações das substâncias, principalmente quando se trata do metabolismo secundário, podendo, algumas das características terapêuticas serem perdidas devido à diminuição na sua concentração na planta a ponto de nem ser percebida. Estas alterações podem ser percebidas exteriormente no comportamento da planta, que em seu local de origem ou de clima semelhante comporta-se como perene. No entanto, em condições subtropicais, a planta comporta-se como anual, sendo que com a diminuição da temperatura no inverno ocorre uma acentuada redistribuição de metabólitos e nutrientes da parte aérea para os rizomas, culminando na completa morte dos tecidos da parte aérea (Cecílio Filho & Souza, 1999).

## 2.5. EXTRATO DE RIZOMAS DE CÚRCUMA PARA CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Diversos autores relatam o efeito de extratos ou óleos essenciais de diversas plantas medicinais no controle *in vitro* de vários patógenos (Bastos, 1997; Santos, 1998; Stangarlin et al. 1999), sendo este tipo de pesquisa uma realidade, que busca métodos alternativos para substituir aqueles que causam impactos ambientais, como o uso de agroquímicos.

O uso de extratos de cúrcuma para o controle de fitopatógenos é relatado por Saju et al. (1998) que consideram o óleo essencial de cúrcuma como um excelente fungistático *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sphaceloma cardamoni*, *Pestalotia palmarum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp..

Singh & Rai (2000) testando vários extratos brutos de plantas para controlar *Fusarium udum*, causador de murcha em guandu, verificaram que, o extrato de cúrcuma mostrou marcante fungitoxicidade *in vitro*, controlando até 100% dependendo da concentração, sugerindo que a substância fungicida tenha sido o p-metoxi cinamato. Raja & Kurucheve (1998) tiveram uma redução no crescimento *in vitro* de *Macrophomina phaseolina* com extrato de cúrcuma (*C. aromatica*).

Nenhuma referência especificamente sobre o uso de cúrcuma contra bactérias patogênicas foi encontrada. No entanto, conforme relatado na seção anterior é comprovada a ação bactericida de substâncias extraídas da cúrcuma, sugerindo a hipótese de seu uso para o controle de fitobactérias.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DA BACTÉRIA

Foram coletados caules de plantas de mandioca da variedade Verdinha, de alta suscetibilidade a bacteriose, que apresentavam lesões características da forma sistêmica provocadas por *X. axonopodis* pv. *manihotis*, provenientes de lavouras da região Oeste do Paraná.

O isolamento foi feito de acordo com a metodologia proposta por Mariano & Silveira (2000). Para tanto, cortou-se uma amostra do caule com infecção, o qual foi imerso em álcool, realizando em seguida a flambagem para esterilização da parte externa deste. Posteriormente, foi feita a retirada da casca com auxílio de estiletes flambados e em seguida foram retirados pedaços do xilema que se apresentavam escurecidos devido a ação do patógeno. A seguir, os fragmentos foram colocados em tubos de ensaio esterilizados, juntamente com 1 mL de água destilada e esterilizada, macerando-se o material com o auxílio de um bastão de vidro flambado. Deixou-se em repouso por 20 min, para que houvesse difusão da população bacteriana para a água.

Após o repouso, foi colocada uma gota do macerado em lâmina limpa e cobriu-se com lamínula, sendo observado ao microscópio sob lente de imersão para constatar a presença de bactérias. Com alça de platina foi retirada uma gota do macerado a qual foi espalhada sobre uma pequena área do meio de cultura próximo

a um dos bordos da placa, sendo que a superfície do meio não sofreu arranhões. Sem flambar a alça foram traçadas quatro riscas paralelas espaçadas de 0,5 cm, sendo a primeira a 1 cm do local onde foi descarregada a suspensão. As quatro riscas não ultrapassaram o meio da placa. A alça foi flambada, e, depois de fria, foram feitas outras quatro riscas paralelas em ângulo reto, partindo da primeira risca da primeira série. Observando-se os mesmos princípios, foram traçadas outras quatro riscas paralelas, em ângulo reto com a segunda série, e, repetindo-se a operação foi traçado ângulo reto com a terceira série. A placa foi identificada, invertida e incubada a 25 °C. O meio de cultura utilizado foi ágar-nutriente-amido.

### 3.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PATOGÊNICA DO ISOLADO BACTERIANO

#### 3.2.1. Reação de Hipersensibilidade em Fumo

A reação de hipersensibilidade em fumo foi efetuada conforme a metodologia proposta por Mariano (2000), preparando-se uma suspensão bacteriana com colônias jovens, em meio de cultura sólido, as quais foram lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) sendo a concentração ajustada para  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 mL, cuidadosamente foi infiltrada a suspensão bacteriana nos espaços intercelulares, da região contida entre duas nervuras laterais da face abaxial da folha de fumo. As áreas infiltradas foram etiquetadas e as plantas mantidas em casa de vegetação. A avaliação foi realizada 24 h após a infiltração, observando-se a existência ou não da reação de hipersensibilidade, caracterizada por necrose e dessecamento do tecido. O patógeno em questão apresenta reação negativa ao teste de hipersensibilidade.

#### 3.2.2. Teste Para a Hidrólise do Amido

Conforme Mariano et al. (2000), o isolado bacteriano foi riscado com alça de platina em meio ágar-nutriente-amido e incubado a uma temperatura de 25 °C. Após três dias, avaliou-se o consumo de amido utilizando-se o reagente lugol, cobrindo-se inteiramente a placa com o mesmo e esperando-se alguns minutos. A presença de zonas claras ao redor do crescimento bacteriano indica que o amido foi hidrolisado. O patógeno apresenta a característica de hidrolisar o amido.

### 3.2.3. Reprodução de Sintomas da Doença

O isolado bacteriano foi inoculado em folhas de mandioca para verificar a patogenicidade deste, adotando-se para isto, o método da injeção descrito por Mariano & Assis (2000a), o qual consiste em injetar a suspensão bacteriana nos espaços intercelulares da folha, conforme descrita no item 3.2.1. O aparecimento de sintomas é determinante para a identificação do patógeno.

### 3.3. CULTIVO E MANUTENÇÃO DO ISOLADO BACTERIANO

Para cultivo e manutenção do isolado bacteriano foi utilizado o meio 523 de Kado & Heskett (1970), constituído de 10 g de sacarose, 8 g de caseína ácida hidrolisada, 4 g de extrato de levedura, 2 g de  $K_2HPO_4$ , 0,3 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada.

A manutenção foi por preservação da bactéria através do método simples de armazenamento de bactérias fitopatogênicas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , descrito por Mariano & Assis (2000b), uma vez que sucessivas repicagens podem ocasionar a perda da patogenicidade da bactéria. Para tanto, foram colocados 0,6 mL de solução de glicerol a 20% e 0,4 mL de caldo nutritivo (meio 523 sem ágar), em tubos para microcentrifuga de 1,5 mL. Após autoclavagem adicionou-se duas alças cheias de células bacterianas obtidas em meio sólido. Posteriormente, os tubos foram agitados em agitador Vórtex e armazenados em freezer a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , protegidos com isopor. Para recuperar a cultura, foi retirado um pouco de massa bacteriana congelada contida no tubo, com alça de platina e riscada imediatamente em placa com meio 523.

### 3.4. OBTENÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A curva de crescimento bacteriano foi obtida pelo método de determinação da concentração do inóculo pela contagem em placas, descrito por Mariano & Assis (2000c). Preparou-se suspensão da bactéria a partir de culturas jovens (48 h) em meio sólido ajustando-se concentrações bacterianas para obter leituras de absorbância (a 580 nm) de 2,4; 2,0; 1,6; 1,2; 0,8 e 0,4, sendo ao todo seis suspensões com as seis absorbâncias indicadas.

Cada uma das suspensões foi submetida a uma série de diluições, através de transferências sucessivas de 1 mL da suspensão para tubos com 9 mL de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. Para as absorvâncias 2,4; 2,0 e 1,6 foram feitas diluições de até  $10^8$ , sendo utilizadas as três últimas. Para as absorvâncias 1,2; 0,8 e 0,4 foram feitas diluições até  $10^7$  utilizando-se as três últimas diluições.

Para cada diluição, 0,1 mL foi espalhado uniformemente com alça de vidro flambada, em placas de petri com meio 523, preparando-se três placas de cada diluição, ou seja, três repetições, e, desta forma, nove placas para cada absorvância, num total de 45 placas para o isolado bacteriano. As placas foram invertidas e incubadas por 48 h em estufa a 25 °C.

Para cada absorvância foi obtida pelo menos uma série de placas contáveis, sendo que uma placa contável apresentava entre 30 e 300 colônias. O cálculo da concentração da suspensão será efetuado da seguinte forma:  $\text{UFC ml}^{-1} = \text{número médio de colônias} \times \text{diluição da mostra} \times 10$ . Os dados de concentração (UFC) foram transformados para uma mesma base de  $10^2$ , para este caso,  $10^7$ . Foi elaborada uma tabela com os dados obtidos, relacionando a absorvância com a concentração de UFC  $10^7$ . Estes dados foram lançados num programa estatístico que fez regressão linear para estabelecer a equação da reta  $y = a + bx$  onde y representa absorvância da suspensão e x representa concentração da suspensão bacteriana.

### 3.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE CÚRCUMA

Foram coletados rizomas de cúrcuma (**Figura 1**) de quatro diferentes regiões produtoras do Brasil: Jaboticabal/SP, Mara Rosa/GO, Maringá/PR e Mercedes/PR. Estes rizomas foram coletados frescos conforme a época de colheita de cada região e armazenados a  $-20$  °C para manter as características químicas o mais estável possível.

Os genótipos de cúrcuma coletados apresentavam diferenças morfológicas visíveis nos rizomas, diferenciando-se principalmente quanto à coloração e tamanho.

Rizomas provenientes de Jaboticabal e Mara Rosa apresentavam altura de planta (70 cm) e coloração dos rizomas (amarela) semelhantes, enquanto que rizomas provenientes de Mercedes, embora apresentassem a mesma altura de planta que os anteriores, possuíam rizomas menores e coloração alaranjada. Os

rizomas provenientes de Maringá eram de tamanho maior e possuíam coloração amarela fraco, apresentando parte aérea maior (90 cm). A diferença na coloração dos extratos de Maringá e Mercedes podem ser visualizados na **Figura 2**.



**Figura 1.** Planta de cúrcuma (*C. longa*). No detalhe seus rizomas.



**Figura 2.** Extratos de rizomas de *C. longa* (cúrcuma) provenientes de Maringá (Mar) e Mercedes (Mer) na concentração de 1%.

O extrato bruto foi obtido de acordo com Stangarlin et al. (1999), a partir da trituração de rizomas de cúrcuma com o auxílio de liquidificador, em água destilada, na dosagem de 200 g L<sup>-1</sup> de água. O homogenado foi filtrado em gaze e papel de filtro Whatman n° 41, para eliminação de restos de células vegetais, constituindo assim, um extrato líquido a 20%. A partir deste foram feitas diluições para se obter extratos nas concentrações de 15, 10, 5 e 1%, os quais foram utilizados para preparar o meio de cultura para o crescimento bacteriano.

### 3.6. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE CÚRCUMA

O meio de cultura 523 líquido foi preparado contendo 20, 15, 10, 5 e 1% de extrato de cúrcuma, de cada variante genético. Também foi feito um controle com o meio sem a presença de extrato e controle com a presença de antibiótico (22,5 mg L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina + 225 mg L<sup>-1</sup> de estreptomicina). Foram feitos cinco repetições de cada tratamento.

A bactéria foi repicada pipetando-se uma alíquota de 0,1 mL de solução contendo 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> que foi adicionado a cada tratamento e incubado a 25 °C por 48 h, sob agitação.

A avaliação do número de bactérias foi feita por espectrofotômetro UV/VIS anotando-se a absorbância de cada amostra e calculando-se o valor do número de células pela equação  $y = a + bx$  de acordo com a curva de calibração descrita no item 3.4. A leitura de absorbância foi feita contra meio de cultura sem a bactéria, zerando-se o aparelho para cada nova concentração de cúrcuma.

### 3.7. TRATAMENTO DE MANIVAS DE MANDIOCA COM EXTRATO DE CÚRCUMA

Os caules de mandioca infectados foram cortados em manivas de 12 cm e tratados com extrato de cúrcuma de dois variantes genéticos, os quais apresentaram o melhor e o pior comportamento em relação à inibição do crescimento bacteriano *in vitro* (conforme item 3.6).

As manivas foram, colocadas na posição vertical dentro de recipientes contendo o extrato nas concentrações de 1 e 10%, ficando uma porção correspondente a metade do seu comprimento submersa por 72 h à temperatura

ambiente ( $\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Franzener et al., 2001). Por movimento de capilaridade o líquido penetra nos vasos do xilema, sendo que o extrato foi distribuído por todo sistema vascular da maniva (**Figura 3**). Considerando que o ambiente favorável para o patógeno seja o interior dos vasos, não foi efetuado tratamento externo das manivas na metade não submersa. Foram feitos dois tratamentos controles: um com ADE (água destilada e esterilizada) e outro com solução de  $22,5\text{ mg L}^{-1}$  de oxitetraciclina +  $225\text{ mg L}^{-1}$  de estreptomicina. Para cada tratamento foram utilizadas 87 manivas.



**Figura 3.** Tratamento das manivas de mandioca por imersão de metade do seu comprimento na solução tratamento. No detalhe, presença de pus bacteriano na maniva.

### 3.7.1. Plantio em Solo Esterilizado

Manivas tratadas conforme item 3.7 foram plantadas em caixas de madeira tipo K, com solo previamente esterilizado. Em cada caixa foram plantadas três manivas, com cinco caixas por tratamento.

As avaliações foram efetuadas no decorrer de 90 dias após o plantio, observando-se o percentual de brotamento e sintomas típicos da doença para confirmar a presença ou não nas manivas tratadas.

### 3.7.2. Plantio a Campo Para Avaliação da Produtividade e Severidade

A avaliação da produtividade da mandioca foi efetuada em plantio a campo na estação experimental Antônio Carlos dos Santos Pessoa, pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon/PR. A área anteriormente era utilizada apenas para cultivo de milho e soja. 72 manivas tratadas conforme item 3.7 foram plantadas a campo para cada tratamento, em delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições conforme Fukuda & Borges (1991). As parcelas continham 18 plantas, sendo utilizadas as 16 plantas centrais como parcela útil. O espaçamento de plantio foi de 1 m entre linhas e 0,6 m entre plantas, com quatro linhas de nove plantas, sendo as duas linhas centrais da variedade Verdinha e as duas bordaduras da variedade Fécula Branca. Na bordadura foi plantada variedade de mandioca resistente ao patógeno para evitar a transferência do patógeno de uma parcela para a outra por fatores ambientais. O plantio foi efetuado sem o uso de adubação, conforme prática freqüentemente utilizada na região Oeste do Paraná.

Os sintomas presentes nas plantas foram avaliados de acordo com escala proposta por Miura et al. (1990), considerando escala de notas de 0 a 5, sendo: 0, planta sem sintoma; 1, presença de pequenas manchas angulares nos folíolos; 2, aparecimento de lesões do tipo requeima nos folíolos, e murcha de folhas; 3, exsudação de gomas nos pecíolos, murcha de folhas e queda de folhas; 4, lesões necróticas nas hastes, com ou sem exsudação de goma, murcha de folha, desfolhamento parcial e morte dos brotos apicais e 5, presença de grandes lesões necróticas nas hastes, intenso desfolhamento, morte acentuada de hastes, ou ainda, morte total da planta.

A avaliação da produtividade foi realizada um ano após o plantio.

### 3.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de rizomas de cúrcuma foram submetidos a análise de variância segundo o arranjo fatorial, num delineamento inteiramente ao acaso com dois fatores: genótipo (4 subníveis: genótipos de Mara Rosa, Jaboticabal, Maringá e Mercedes) e concentrações (6

subníveis: 0, 1, 5, 10, 15 e 20% de extrato) com 5 repetições, comparados a testemunha com antibiótico.

Os dados de plantio em solo esterilizado foram submetidos a análise de variância geral num delineamento inteiramente ao acaso, sendo os tratamentos: ADE, antibiótico, genótipos de Maringá e Mercedes em concentrações de 1 e 10%, com cinco repetições.

Os dados de plantio a campo foram avaliados mediante análise de variância geral de delineamento em blocos ao acaso, sendo os mesmos tratamentos para o plantio em solo esterilizado, porém, com quatro repetições.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PATOGÊNICA DO ISOLADO BACTERIANO

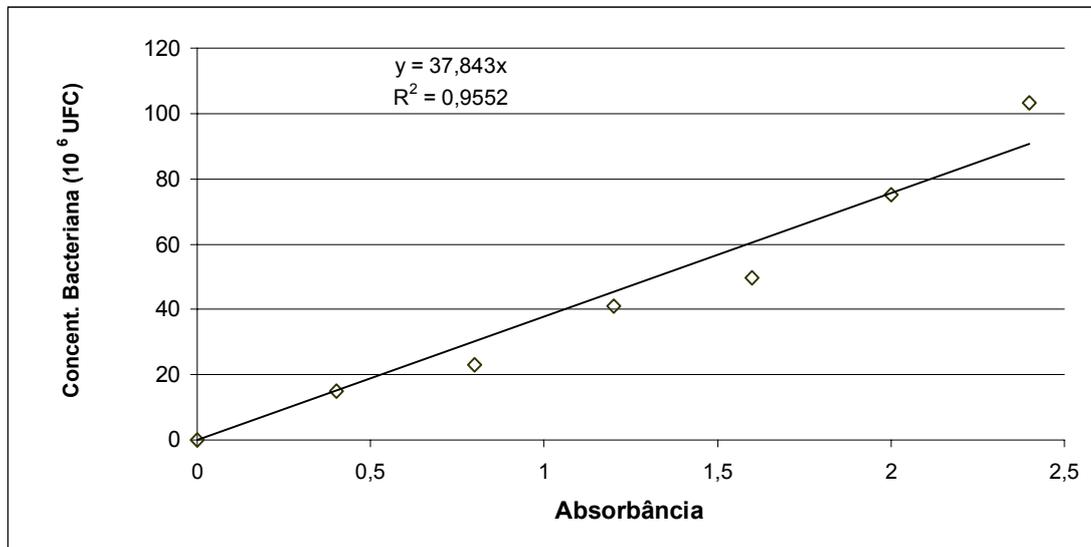
Vários isolados foram recuperados, porém apenas os isolados que apresentaram consumo de amido positivo, reação de hipersensibilidade em fumo negativa e que apresentassem a reprodução de sintomas típicos da doença em folhas de mandioca foram aproveitados para o experimento.

### 4.2. AÇÃO ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

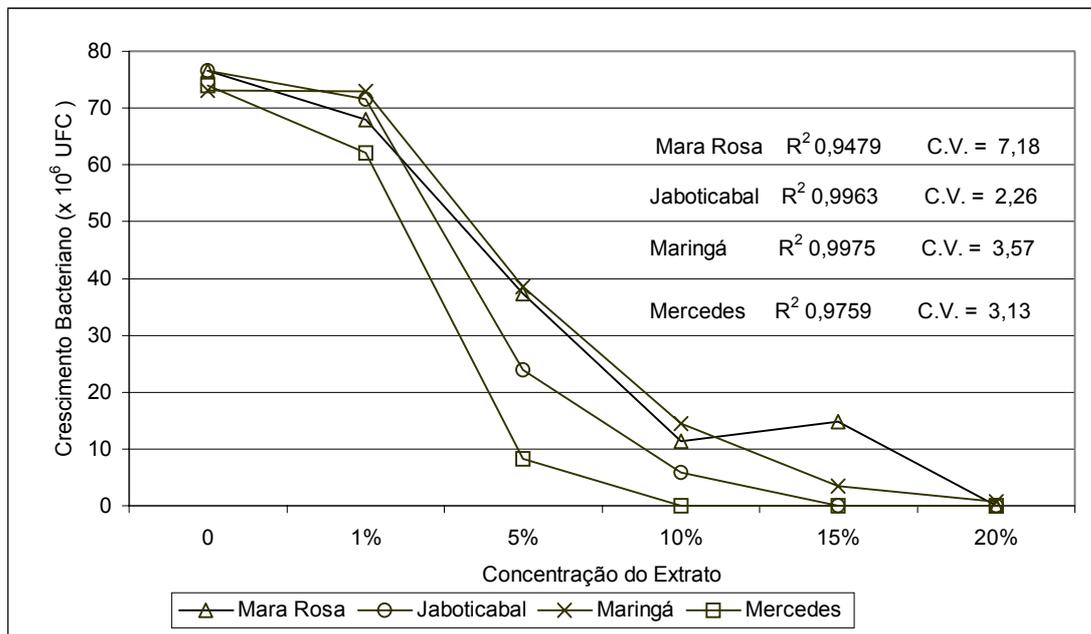
A partir do momento em que o patógeno foi isolado, identificado e conservado, construiu-se uma reta de concentração bacteriana em função de valores de absorbância a 580 nm. Esta reta pode ser visualizada na **Figura 4**. O comportamento da concentração bacteriana em relação à absorbância foi linear, com equação da reta sendo  $y = 37,843x$ , a qual apresenta um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9552.

O efeito da concentração do extrato aquoso dos rizomas de cúrcuma sobre *X. axonopodis* pv. *manihotis* pode ser observado na **Figura 5**. Para os quatro genótipos avaliados neste trabalho verificou-se dependência nas dosagens utilizadas pela ocorrência de regressão significativa a 1% (Quadro 1 da análise de

variância – anexos) com inibição do crescimento para doses crescentes do extrato de cúrcuma.



**Figura 4.** Ajuste da reta de concentração bacteriana (em unidades formadoras de colônias – UFC) em função da absorbância a 580 nm.



**Figura 5.** Efeito do extrato aquoso de rizomas de quatro genótipos de *C. longa* sobre o crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *manihotis*. Crescimento expresso em unidades formadoras de colônias (UFC).

Na **Tabela 1** pode-se observar mais detalhadamente os valores de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada genótipo em cada concentração utilizada.

Percebe-se que o genótipo de Mercedes inibiu o crescimento bacteriano a partir da concentração 5% em relação a testemunha com antibiótico, alcançando o máximo de inibição já com a concentração de 10% de extrato bruto de cúrcuma. Os demais genótipos demonstram seu potencial bactericida apenas a partir da concentração de 10%. O genótipo de cúrcuma proveniente de Maringá foi o único que não inibiu totalmente o crescimento bacteriano para a concentração máxima testada de 20%. Os genótipos de Mara Rosa, Jaboticabal e Maringá, todos a partir de concentração de 10%, e o de Mercedes a partir da concentração de 5%, permitiram inibição do crescimento bacteriano maior do que o tratamento com antibiótico.

A existência de diferenças entre os materiais está intimamente ligada aos compostos presentes nos rizomas, não podendo identificar por este trabalho qual o composto responsável pela ação antibacteriana, uma vez que o extrato bruto possui composição extremamente complexa. Observou-se que o efeito *in vitro* pode estar associado à coloração do extrato, sendo que extrato de coloração mais alaranjada possui maior efeito do que material amarelado. Neste caso, rizomas provenientes de Mercedes (alaranjado) proporcionaram maior inibição em relação ao material de Maringá (amarelo fraco), estando os materiais de Jaboticabal e Mara Rosa em tom intermediário de amarelo, coincidentemente valores intermediário de controle.

**Tabela 1.** Crescimento de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, expresso em unidades formadoras de colônias ( $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>), em presença de diferentes concentrações do extrato bruto aquoso de quatro genótipos de *C. longa* (cúrcuma).

Genótipos	Concentrações do Extrato					
	0	1%	5%	10%	15%	20%
Mara Rosa	76,61 a <sup>(+)</sup>	68,00 ab <sup>(+)</sup>	37,20 a <sup>(+)</sup>	11,32 a <sup>(-)</sup>	14,27 a <sup>(-)</sup>	0,00 b <sup>(-)</sup>
Jaboticabal	76,54 a <sup>(+)</sup>	71,60 a <sup>(+)</sup>	23,87 b <sup>(+)</sup>	5,79 b <sup>(-)</sup>	0,00 c <sup>(-)</sup>	0,00 b <sup>(-)</sup>
Maringá	73,05 a <sup>(+)</sup>	72,97 a <sup>(+)</sup>	38,53 a <sup>(+)</sup>	14,45 a <sup>(-)</sup>	3,40 b <sup>(-)</sup>	0,40 a <sup>(-)</sup>
Mercedes	74,02 a <sup>(+)</sup>	62,06 b <sup>(+)</sup>	8,26 c <sup>(-)</sup>	0,00 c <sup>(-)</sup>	0,00 c <sup>(-)</sup>	0,00 b <sup>(-)</sup>
Testemunha*	16,42					

Médias na coluna seguidas de letras distintas indica diferença pelo teste de Tukey a 1%

<sup>(+)</sup> indica diferença significativa da testemunha, sendo superior a esta.

<sup>(-)</sup> indica diferença significativa da testemunha, sendo inferior a esta.

\* Testemunha: antibiótico (22,5 mg L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina + 225 mg L<sup>-1</sup> de estreptomicina).

Pereira & Stringheta (1998) relatam que curcuminóides possuem ação bacteriostática, bem como o óleo essencial apresenta mesma ação. Os curcuminóides apresentam coloração amarelada e o óleo essencial pode variar de amarelo pálido a alaranjado. Assim, a influência da coloração dos rizomas no controle do patógeno neste trabalho pode estar associada a um determinado composto que proporciona esta coloração.

#### 4.3. AÇÃO TERAPÊUTICA IN VIVO

##### 4.3.1. Plantio em Solo Esterilizado

Ao contrário do que ocorreu no experimento *in vitro*, os extratos de cúrcuma, bem como o tratamento com antibiótico, não proporcionaram a eliminação do patógeno das manivas infectadas. Isto pode ser visualizado na **Tabela 2**, que apresenta valores de emergência de plantas, com variação de 6,6 a 26,6%. Durante o período deste experimento, notou-se a morte de plantas, sendo efetuado, desta forma, uma segunda avaliação 90 dias após a emergência. Pode-se então visualizar a perda de uma planta para o tratamento com antibiótico e de uma planta para o tratamento com extrato de rizomas de Mercedes na concentração de 1%.

**Tabela 2.** Percentual de plantas na emergência e 90 dias após a emergência e presença de sintomas em função do tratamento de manivas de mandioca, infectadas com *X. axonopodis* pv. *manihotis*, com extrato aquoso de quatro genótipos de *C. longa* (cúrcuma).

Tratamentos	Porcentagem de planta na:		Sintomas típicos da doença
	Emergência**	90 dias após emergência**	
Água destilada	13,3	13,3	Presença
Químico*	26,6	20,0	Presença
Extrato de Cúrcuma de:			
Mercedes 1%	20,0	13,3	Presença
Mercedes 10%	6,6	6,6	Presença
Maringá 1%	6,6	6,6	Presença
Maringá 10%	26,6	26,6	Presença

\* 22,5 mg L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina + 225 mg L<sup>-1</sup> de estreptomicina.

\*\* Sem diferença estatística

Para as plantas que sobreviveram avaliou-se a presença de sintomas como coloração de sistema vascular de haste e raízes, observando que todas plantas apresentaram escurecimento de vasos a exceção de uma repetição do tratamento com antibiótico.

Assim pode-se considerar que o extrato de rizoma de cúrcuma na concentração utilizada e na condição do experimento não proporcionou a eliminação do patógeno.

#### 4.3.2. Plantio a Campo

Os resultados do plantio a campo, com relação ao percentual de plantas existentes no período de condução de um ano, são apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Percentual de plantas de mandioca infectadas com *X. axonopodis* pv. *manihotis* tratadas com extrato aquoso de rizomas de *C. longa* (cúrcuma).

Tratamentos	Porcentagem de plantas
Água destilada	37,36 a**
Químico*	30,12 ab
Extrato de cúrcuma de:	
Maringá 1%	38,73 a
Maringá 10%	25,01 bc
Mercedes 1%	20,36 bc
Mercedes 10%	16,39 c
C.V. (%)	19,38
Média geral	27,38

\* 22,5 mg L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina + 225 mg L<sup>-1</sup> de estreptomicina.

\*\* Valores seguidos de letras distintas indicam diferença pelo teste de Tukey a 5%.

Pôde-se perceber que manivas sem tratamento e tratadas com antibiótico proporcionaram mesma porcentagem de plantas que o tratamento com extrato de cúrcuma proveniente de Maringá na concentração de 1%. Coincidentemente, este genótipo foi o que se apresentou com menor potencial para controle da bactéria no teste *in vitro*. A cúrcuma de Maringá, na concentração de 10%, diferenciou-se da testemunha, mostrando-se prejudicial para a mandioca, juntamente com o extrato proveniente de Mercedes a 1%. O extrato do genótipo proveniente de Mercedes a

10% mostrou-se mais fitotóxico ainda para as manivas, proporcionando a menor porcentagem de plantas no estande.

Nesta situação podemos perceber que, da mesma forma que os extratos foram prejudiciais para a bactéria, também foram para as plantas de mandioca que já estavam debilitadas por causa do patógeno.

A presença dos compostos existentes nos rizomas de cúrcuma pode ser prejudicial para a mandioca de três formas que precisam ser melhores estudadas. Possivelmente, haja ação direta dos compostos da cúrcuma sobre os processos fisiológicos do brotamento; ou estes compostos podem ter apenas prejudicado o desenvolvimento fisiológico inicial da maniva de forma que o patógeno tenha se sobressaído; ou ainda, o extrato pode ter induzido suscetibilidade ao patógeno.

Durante a condução do experimento a campo houve morte de plantas em função do desenvolvimento da doença, conforme se pode observar na **Tabela 4**. Porém, esta mortalidade de plantas não foi significativa até o fim do período de avaliação, bem como, também não houve interação entre os tratamentos e época de coleta (Quadro 2 da análise de variância - anexos). Isso significa que os tratamentos aplicados não interferiram no processo patogênico e ocorrência das mortes, posteriormente ao estabelecimento das plantas, ficando seu efeito restrito ao período de plantio a emergência.

**Tabela 4.** Porcentagem de plantas de mandioca em diferentes dias após a emergência a partir de manivas infectadas com *X. axonopodis* pv. *manihotis* e tratadas com extrato de rizomas de *C. longa* (cúrcuma).

Dias após a emergência	Plantas no estande (%)*
15	32,36
90	26,47
180	25,50
370	24,45

\* Sem diferença estatística

Ao analisar o experimento a campo quanto à severidade da doença constatou-se que para todos os tratamentos a severidade da doença permaneceu no nível de severidade 4 na escala proposta por Miura et al. (1990). Tal nível compreende lesões necróticas nas hastes, com ou sem exsudação de goma,

murcha de folha, desfolhamento parcial e morte dos brotos apicais, apresentando escurecimento de vasos abaixo da lesão apical.

Dessa forma pode-se verificar que os extratos de cúrcuma não se apresentaram prejudicial ao patógeno presente nas manivas, pois tanto no experimento com solo esterilizado como a campo, plantas morreram com sintomas de bacteriose, bem como plantas que não morreram também apresentaram sintomas.

A produtividade da mandioca no experimento a campo comportou-se independente dos tratamentos, não sendo observada diferença significativa. Os valores de produtividade podem ser observados na **Tabela 5**. A produtividade no Oeste do Paraná de acordo com Groxko (2002), é de 25 t ha<sup>-1</sup>, bem superior à observada neste experimento. A baixa produtividade obtida no ensaio está diretamente ligada ao baixo estande de plantas proporcionado pela ocorrência da bacteriose.

**Tabela 5.** Produtividade da mandioca em função do tratamento de manivas infectadas com *X. axonopodis* pv. *manihotis*, com antibiótico e extrato aquoso de rizomas de *C. longa* (cúrcuma).

Tratamentos	Produtividade (kg/ha)**
Água destilada	10.386,9
Químico*	10.535,7
Extrato de cúrcuma de:	
Maringá 1%	9.642,8
Maringá 10%	9.642,8
Mercedes 1%	9.464,2
Mercedes 10%	7.232,1
C.V. (%)	44,48
Média Geral (kg/ha)	9.484,1

\* 22,5 mg L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina + 225 mg L<sup>-1</sup> de estreptomicina.

\*\* Sem diferença estatística.

Franzener et al. (2001) utilizando extrato bruto de cânfora (*Artemisia camphorata*) e trabalhando em solo esterilizado, também não obtiveram controle da bacteriose da mandioca a partir do tratamento de manivas infectadas. Esses autores

também trataram as manivas por termoterapia, sem, no entanto, conseguir um controle satisfatório da bacteriose. Embora o extrato de cânfora não tenha proporcionado o controle da doença, o mesmo não se mostrou fitotóxico, como observado para o extrato do rizoma de cúrcuma nos experimentos realizados.

## 5. CONCLUSÕES

- a – Extrato aquoso de cúrcuma apresenta ação bactericida *in vitro* contra *X. axonopodis* pv. *manihotis*;
- b – A ação bactericida do extrato de rizomas de cúrcuma é diferenciada em função das características intrínsecas de plantas provenientes de diferentes regiões geográficas;
- c – Os extratos do rizoma de cúrcuma nas concentrações utilizadas, não apresentaram efeito curativo em manivas de mandioca infectadas com *X. axonopodis* pv. *manihotis*;
- d – Os extratos de rizomas de cúrcuma, dependendo da procedência e da concentração, podem ser fitotóxicos à mandioca.

## 6. REFERÊNCIAS

ALKOFAHI, A; BATSHOUN, R.; OWAIS, W.; NAJIB, N. Biological activity of some Jordanian medicinal plant extracts. Part II. **Fitoterapia**. v. 68(2), p. 163-168, 1997.

AMARAL, J.F. Caracteres bioquímicos do *Xanthomonas manihotis* e *X. rubrisubalbicans* e suas posições na chave de Burkholder (*Schizomicetes, Pseudomonadaceae*) **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 25, p. 67-72, 1958.

APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 49, p. 163-169, 1995.

ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M.E.F.; LEON, L.L. *Leishmania amazonensis*: *in vivo* experiments with diarylheptanoids from leguminosae and Zingiberaceae plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93 (supl. II), p. 306, 1998.

ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M.E.F.; GOMES-CARDOSO, L.; LEON, L.L. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 791-794; 1999.

ARAUJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96(5), p. 723-728; 2001.

BAHIA, Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia. **Cultura – Mandioca**. Disponível em: <<http://www.bahia.ba.gov.br/seagri/Mandioca.htm#Botânica/Descrição/Variedades>> Acesso em: 16 maio 2001.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis permniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**. v. 22 n. 3, setembro 1997. p. 441-443.

BENETT, R.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**. v. 127, 1994. p. 617-633.

BURAGOHAJN, J.; DUTTA, G.N. Evaluation of an externally applied herbal gel, AV/AMP/14, for the treatment of bovine subclinical mastitis. **Indian Veterinary Journal**. v. 75(8), p. 734-735; 1998.

CASTRO, P. R. C.; RODRIGUES, J. D.; MORAIS, M. A.; CARVALHO, V. L. M. Efeitos alelopáticos de alguns extratos vegetais na germinação do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz). **Planta Daninha**. v. 6, 1983. p. 79-85.

CECÍLIO FILHO, A. B. **Época e densidade de plantio sobre a fenologia e rendimento da cúrcuma (*Curcuma Longa* L.)**. Lavras MG, 1996. 100 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras.

CECÍLIO FILHO, A. B.; SOUZA, R. J. de; BRAZ, L. T.; TAVARES, M. Cúrcuma: medicinal, condimentar e outros usos potenciais. **Ciência Rural**. Santa Maria v. 30, n. 1. 2000. p. 171-175.

CECÍLIO FILHO, A. B.; SOUZA, R. J. de Caracterização dos estádios fenológicos da cúrcuma, em função da época e densidade de plantio. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 17 n. 3, novembro de 1999. p. 248-253.

CHANDER, H.; AHUJA, D. K.; NAGENDER, A.; BERRY, S. K. Repellency of different plant extracts and commercial formulations used as prophylactic sprays to protect bagged grain against *Tribolium castaneum* - a field study. **Journal of Food Science and Technology Mysore**. v. 37(6), p. 582-585; 2000.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539 p.

CURCUMA, **Curcuma**. Disponível em: <<http://www.tomdaservas.com.br/acafrao.html>> Acesso em: 05 fevereiro 2003.

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Plantas medicinais: Arte e Ciência – Um Guia de Estudos Multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Paulista. 1996. p. 109-127.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella brioniae*. **Journal Phytopathology**. v. 148, p. 483-487, 2000.

FRANZENER G.; CASSOL, L. P.; STANGARLIN, J. R.; PORTZ, R. L.; KUHN, O. J.; FACCIONI, R.; FURLANETO, C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. da S.

Ocorrência de doenças na cultura da mandioca em Marechal Cândido Rondon/PR e controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em manivas através de termoterapia e tratamento com extrato de *Artemisia camphorata*. **Scientia Agraria Paranaensis**. v.1, n. 2, 2001.

FUKUDA, W. M. G.; BORGES, M. de F. Variação do teor e rendimento de farinha de mandioca em função da variedade e idade de colheita. **Revista Brasileira de Mandioca**. Cruz das Almas, v. 10 n. 1/2, junho 1991. p. 87-95.

GROXKO, M. **Mandioca**. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/seab/mandioca.pdf>> Acesso em: 24 junho 2002.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL J. E. (Ed.). **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. Boca Raton: CRC-Lewis Publishers, 1997. p. 177-199.

HWANG, J.K.; SHIM, J.S.; PYUN, Y.R. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. **Fitoterapia**. v. 71(3), p. 321-323; 2000.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. v. 60, 1970. p. 969-976

KIMATI, H. Controle químico In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997. v. 1. p. 761-785.

KOLTE, A.Y.; SADEKAR, R.D.; MODE, S.G.; GAWAI, G.R. Comparative efficacy of indigenous medicinal plant preparation and tilox in subclinical mastitis in cows. **Indian Veterinary Journal**. v. 76(10), p. 893-895; 1999.

LATHA, C.; AMMINI, J. *Curcuma raktakanda* is a potential larvicide for mosquito control. **Pharmaceutical-Biology**. v. 38(3), p. 167-170; 2000.

LEAN, L.P.; MOHAMED, S. Antioxidative and antimycotic effects of turmeric, lemongrass, betel leaves, clove, black pepper leaves and *Garcinia atriviridis* on butter cakes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79(13), p. 1817-1822, 1999.

LIN, J.K.; LIN-SHIAU, S.Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life Sciences**. v. 25(2), p. 59-66; 2001.

LOPES, C. A. Controle de fitobacterioses. **Fitopatologia Brasileira**. v. 23 (suplemento), agosto 1998. p. 202-203.

LOZANO, J. C.; SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia: Etiology **Phytopathology**. v. 64, 1974a. p. 74-82.

LOZANO, J. C.; SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia: epidemiology and control. **Phytopathology**. v. 64, 1974b. p. 83-88.

MARIANO, R. L. R. Reações de hipersensibilidade a bactérias fitopatogênicas. In: \_\_\_\_\_. (Coord.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p. 65-66.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Inoculação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000a. p. 53-64.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000b. p. 37-47

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000c. p. 49-52

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p. 67-108.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Isolamento de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p. 27-35.

MARTINS, M. C.; RUSIG O. Cúrcuma: um corante natural. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26 n. 1, 1992. p. 56-65.

MASSOLA JUNIOR, N. S. & BEDENDO, I. P. Doenças da mandioca, In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997. v. 2. p. 501-503.

MAZUMDER, A.; RAGHAVAN, K.; WEINSTEIN, J.; KOHN, K.W.; POMMIER, Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. **Biochemical Pharmacology**. v. 49(8) p. 1165-1170, 1995.

MIURA, L.; FROSI, J. F.; MONDARDO, E.; TERNES, M. Seleção de germoplasma de mandioca resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**., Brasília, v. 25 n. 8, agosto de 1990. p. 1209-1214.

MIURA, L.; MONTEIRO, A. J. A. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) - Controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas:**

**Grandes culturas.** Viçosa – MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília – DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. v. 2 p. 791-814.

MORAES, W. B. C. Controle Alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** Brasília, v. 27, s/n, 1992. p. 175-190.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed) **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos.** São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v. 1. P. 417-454.

PEREIRA, A. S.; STRINGHETA, P. C. Considerações sobre a cultura e processamento do açafrão. **Horticultura Brasileira.** Brasília, v. 16 n. 2, nov. 1998. p. 102-105.

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R. Doenças da cultura da mandioca, In: DUARTE, M. de L. R. **Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro – Plantas industriais.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. v. 1. p. 139-157.

RAJA, J.; KURUCHEVE, V. Influence of plant extracts and buffalo urine on the growth and sclerotial germination of *Macrophomina phaseolina*. **Indian Phytopathology.** v. 51(1), p. 102-103; 1998.

RASMUSSEN, H.B.; CHRISTENSEN, S.B.; KVIST, L.P.; KARASMI, A. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. **Planta Med.** v. 66, p. 396-398, 2000.

RUBY, A.J.; KUTTAN, G.; BABU, K.D.; RAJASEKHARAN, K.N.; Kuttan, R. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. **Cancer Letters.** v. 94 p. 79-83, 1995.

SAJU, K. A.; VENUGOPAL, M. N.; MATHEW, M. J. Antifungal and insect-repellent activities of essential oil of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Current Science.** v. 75(7), p. 660-662; 1998.

SANTOS, M. M. F. B. dos, Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), isolado de *Citrus*. In: MING, L. C.; SCHEFFER, M. C.; CORRÊA Jr., C.; BARROS, I. B. I.; MATOS, J. K. de A. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica.** Botucatu: UNESP [apoio PROIN/CAPE], 1998. v. 1, p. 193-217.

SHARMA, M. C.; DWIVEDI, S. K. Efficacy of a herbal drug preparation against dermatomycosis in cattle and dog. **Indian Veterinary Journal.** v. 67(3), p. 269-271; 1990.

SINGH, R.; RAI, B. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Microbios.** v. 102(403), p. 165-173; 2000.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist.** v. 132. 1996. p. 1-45.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. da S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência & Desenvolvimento**. Brasília, ano. 2, n. 11, 1999. p. 16-21.

UECHI, S.; MIYAGI, Y.; ISHIMINE, Y.; HONGO, F. Antibacterial activity of essential oils from *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) cultivated in Okinawa against foodborne pathogenic bacteria. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**. v. 44(2), p. 138-140; 2000.

YOUNG, J. M.; SADDLER, G. S.; TAKIKAWA, Y.; DE BOER, S. H.; VAUTERIN, L.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R. I.; STEAD, D. E. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Review of Plant Pathology**. v. 75 n. 9, 1996. p. 721-761.

ZWAVING, J. H.; BOS, R. Analysis of the essential oils of five curcuma species. **Flavour and Fragrance Journal**. Chichester, v. 7, 1992. p. 19-22.

## **APÊNDICES**

**Quadro 1.** Análise de variância da regressão do crescimento bacteriano *in vitro* para as concentrações de extrato aquoso de rizomas de quatro genótipos de *C. longa* (cúrcuma). Dados transformados em  $\text{SQRT}(X + 1.00)$ .

		MARA ROSA	JABOTICABAL	MARINGÁ	MERCEDES
CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	Q.M	Q.M	Q.M	Q.M
TRATAMENTO	5	45,7529**	63,0624**	52,3116**	66,3378**
RESÍDUO	24	0,1442	0,0103	0,0341	0,0141
TOTAL	29				
C.V. (%)		7,1838	2,2611	3,5715	3,1299
Média geral		5,2868	4,4875	5,1690	3,7991
R <sup>2</sup>		0,9479	0,9963	0,9975	0,9759

\*\* Diferença significativa a 1%.

Q.M. Quadrado médio

**Quadro 2.** Análise de variância, do experimento *in vitro*, para verificar o efeito de quatro genótipos de *C. longa* sobre o crescimento de *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO	F
ANTIBIÓTICO vs FATORES	1	402532,6149	5,43 *
GENÓTIPOS	3	21416219,4458	289,12 **
CONCENTRAÇÕES	5	258252808,8614	3486,44 **
GENÓT. X CONCENT.	15	4453486,0755	60,12 **
TRATAMENTOS	24	59279896,9330	800,28 **
RESÍDUO	100	74073,5545	
TOTAL	124		
C. V. (%)		6,32	
Média Geral		18,56.10 <sup>6</sup>	

\* Diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

\*\* Diferença significativa pelo teste de Tukey a 1%.

**Quadro 3.** Análise de variância, do experimento em solo esterilizado, para verificar o efeito de extrato de rizomas de dois genótipos de *C. longa* (cúrcuma), sobre a emergência da mandioca. Dados transformados em  $\text{SQRT}(X + 1.00)$ .

CAUSA DE. VARIAÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO.	F
TRATAMENTOS	5	6,2468	0,76 NS
RESÍDUO	24	8,2004	
TOTAL	29		
C.V. (%)		90.87	
Média geral		16,53	

NS - Não significativo

**Quadro 4.** Análise de variância, do experimento em solo esterilizado, para verificar o efeito de extrato de rizomas de dois genótipos de *C. longa* (cúrcuma), sobre o número de plantas aos 90 dias após a emergência da mandioca. Dados transformados em  $\text{SQRT}(X + 1.00)$ .

CAUSA DE VARIACÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO.	F
TRATAMENTOS	5	3,5100	0,45 NS
RESÍDUO	24	7,8359	
TOTAL	29		
C.V. (%)		96.13	
Média geral		14,33	

NS - Não significativo

**Quadro 5.** Análise de variância, do número de plantas de mandioca em função dos tratamentos de manivas, infectadas com *X. axonopodis* pv. *manihotis* com extrato de cúrcuma e da época de contagem.

CAUSA DE VARIACÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO	F
Época de Contagem	3	2,5507	2,4349
Tratamentos	5	11,9113	11,3707**
Época x Tratamentos	15	0,0522	0,0498
(Tratamentos)	23	2,9561	
Blocos	3	2,9978	2,8617*
Resíduo	69	1,0475	
Coef. Variação (%)		19,38	
Média Geral		29,33	

\* Diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

\*\* Diferença significativa pelo teste de Tukey a 1%.

**Quadro 6.** Análise de variância, do experimento em campo, para verificar o efeito de extrato de rizomas de dois genótipos de *C. longa* (cúrcuma), sobre a produtividade da mandioca.

CAUSA DE VARIACÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO.	F
BLOCOS	3	24900683,8626	1,40 NS
TRATAMENTOS	5	5634436,6974	0,32 NS
RESÍDUO	15	17795207,0303	
TOTAL	23		
C.V. (%)		44,48	
Média Geral		9.484,10	

NS - Não significativo