

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA**

MARIA ELIZA RIBEIRO

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Tetragonisca angustula* Latreille NO
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS E DOENÇAS DO TOMATEIRO**

LARANJEIRAS DO SUL

2024

MARIA ELIZA RIBEIRO

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *TETRAGONISCA ANGUSTULA* Latreille NO
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS E DOENÇAS DO TOMATEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Agronomia da Universidade Federal da
Fronteira Sul (UFFS), como requisito para
obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Prof. Dr. GILMAR FRANZENER

LARANJEIRAS DO SUL

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Ribeiro, Maria Eliza
EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Tetragonisca angustula* Latreille NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS E DOENÇAS DO TOMATEIRO / Maria Eliza Ribeiro. -- 2024.
30 f.:il.

Orientador: DOUTOR Gilmar Franzener

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2024.

I. Franzener, Gilmar, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

MARIA ELIZA RIBEIRO

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Tetragonisca angustula* Latreille
NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS E DOENÇAS DO TOMATEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Agronomia da Universidade Federal da
Fronteira Sul (UFFS) do *Campus*
Laranjeiras do Sul como requisito parcial
para obtenção do grau de bacharel em
Agronomia.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 20/06/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **GILMAR FRANZENER**
Data: 28/06/2024 15:38:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. GILMAR FRANZENER – UFFS

Orientador

Documento assinado digitalmente
 **CLAUDIA SIMONE MADRUGA LIMA**
Data: 28/06/2024 16:41:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Cláudia Simone Madruga Lima

Avaliador

Documento assinado digitalmente
 **LEONARDO LUCIO ANTONOWICZ DE SOUZA**
Data: 28/06/2024 16:06:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Eng. Agr. Leonardo Lucio Antonowicz de Souza

Avaliador

Dedico este trabalho a minha mãe e meu
namorado, que não pouparam esforços
para que eu pudesse concluir meus
estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para trilhar essa caminhada e a Nossa Senhora Aparecida por ter sido minha intercessora.

Agradeço a minha mãe, por todo o zelo e dedicação que sempre teve comigo, por nunca ter desanimado em meio às tantas tribulações que passou para criar seus 7 filhos sozinha. Aos meus amigos que sempre me apoiaram e me estenderam a mão quando precisei e me incentivaram a seguir em frente.

Quero agradecer ao meu orientador, Gilmar Franzener, pelo estímulo e dedicação ao longo da graduação e deste trabalho. A minha família por ser meu porto seguro, me apoiarem e me fortalecerem com palavras de incentivo.

Ao meu namorado que sempre esteve ao meu lado me dando apoio e me incentivando para que chegasse ao meu objetivo e pudesse chegar nesse tão esperado título de Engenheira Agrônoma.

E a minha irmã Natália Cristina Ribeiro que hoje é o meu anjo da guarda, essa conquista também é sua.

Olhem de novo para o ponto. É ali. É a nossa casa. Somos nós. Nesse ponto, todos aqueles que amamos, que conhecemos, de quem já ouvimos falar, todos os seres humanos que já existiram, vivem ou viveram as suas vidas. Toda a nossa mistura de alegria e sofrimento, todas as inúmeras religiões, ideologias e doutrinas econômicas, todos os caçadores e saqueadores, heróis e covardes, criadores e destruidores de civilizações, reis e camponeses, jovens casais apaixonados, pais e mães, todas as crianças, todos os inventores e exploradores, professores de moral, políticos corruptos, “superastros”, “líderes supremos”, todos os santos e pecadores da história da nossa espécie, ali – num grão de poeira suspenso num raio de sol (Sagan, 1994, p. 10).

RESUMO

Tetragonisca angustula é uma das principais abelhas sem ferrão utilizadas para produção de mel e própolis. Esses derivados produzidos são estudados na saúde humana por suas propriedades medicinais. No entanto, são escassas informações do potencial uso para sanidade vegetal. Assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar o potencial do extrato de própolis de *T. angustula* no controle de doenças do tomateiro. O extrato etanólico da própolis (EEP) foi obtido por maceração por 15 dias em etanol 70%, seguido de filtragem e diluição em água em diferentes concentrações. Em condição de laboratório foram avaliadas as concentrações de 0, 0,1, 0,5, 1, 2 e 3% do extrato etanólico sobre o crescimento micelial dos fungos *Alternaria solani*, *Septoria lycopersici* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e na atividade antibacteriana sobre *Xanthomonas vesicatoria*. Em condições de casa de vegetação foram conduzidos experimentos com aplicação das concentrações do extrato etanólico de própolis de forma preventiva e curativa. Foi realizada a avaliação da severidade das doenças a partir dos primeiros sintomas. O EEP promoveu significativo efeito antifúngico no crescimento micelial de *A. solani*, *S. lycopersici* e *S. sclerotiorum*, com inibição de 84,8, 96,0 e 77,8% em relação à testemunha sem própolis, respectivamente. O EEP também inibiu significativamente *X. vesicatoria*. Em plantas de tomateiro houve pouco efeito das concentrações EEP mas, de maneira geral, aplicações curativas promoveram menores severidades da septoriose em relação a aplicação preventiva. Nas condições do estudo os resultados demonstram a atividade biológica do EEP de *T. angustula* sobre fitopatógenos, embora com resultados mais expressivos *in vitro*.

Palavras-chave: Controle alternativo, *Solanum lycopersicum*, bioproduto.

ABSTRACT

Tetragonisca angustula is one of the main stingless bees used to produce honey and propolis. These produced derivatives are studied in human health for their medicinal properties. However, there is little information on its potential use for plant health. Thus, this work aims to evaluate the potential of *T. angustula* propolis extract in controlling tomato diseases. The ethanolic extract of propolis (EEP) was obtained by maceration for 15 days in 70% ethanol, followed by filtering and dilution in water at different concentrations. Under laboratory conditions, concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1, 2 and 3% of the ethanolic extract were evaluated on the mycelial growth of the fungi *Alternaria solani*, *Septoria lycopersici* and *Sclerotinia sclerotiorum*, and antibacterial activity against *Xanthomonas vesicatoria*. Under greenhouse conditions, experiments were carried out with the application of concentrations of ethanolic extract of propolis in a preventive and curative manner. The severity of the diseases was assessed based on the first symptoms. EEP promoted a significant antifungal effect on the mycelial growth of *A. solani*, *S. lycopersici* and *S. sclerotiorum*, with inhibition of 84.8, 96.0 and 77.8% in relation to the control without propolis, respectively. EEP also significantly inhibited *X. vesicatoria*. In tomato plants there was little effect of EEP concentrations but, in general, curative applications promoted lower severity of septoria in relation to preventive application. Under the study conditions, the results demonstrate the biological activity of *T. angustula* EEP on phytopathogens, although with more significant results in vitro.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, alternative control, bioproduct.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preparo das concentrações de extrato etanólico de própolis para emprego nos experimentos <i>in vivo</i>	19
Figura 2. Preparo e cultivo fúngico em meio de cultura BDA.....	20
Figura 3. Experimento de proteção de plantas de tomateiro.....	21
Figura 4. Plantas de tomateiro mantidas em câmara úmida após inoculação com o patógeno.....	22
Figura 5. Crescimento micelial de <i>Alternaria solani</i> e <i>Septoria lycopersici</i> sob diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis (EEP) de <i>Tetragonisca angustula</i>	23
Figura 6. Crescimento micelial (A) e número de escleródios (B) formados em colônias de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sob diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis (EEP) de <i>Tetragonisca angustula</i>	23
Figura 7. Atividade antibacteriana do extrato etanólico de própolis de <i>Tetragonisca angustula</i> sobre <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	26
Figura 8. Plantas de tomateiro afetadas pela septoriose no experimento com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP) de <i>Tetragonisca angustula</i>	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Severidade da septoriose em plantas de tomateiro tratadas com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP) de *Tetragonisca angustula*...26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 TOMATE	13
3.2 DOENÇAS DO TOMATEIRO	14
3.3 PINTA PRETA OU MANCHA DE ALTERNARIA	14
3.4 SEPTORIOSE	15
3.5 MANCHA BACTERIANA	15
3.5 MOFO BRANCO	16
3.6 ABELHA JATAI	17
3.7 PRÓPOLIS	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 OBTENÇÃO DO PREPARADO DE PRÓPOLIS	18
4.2 ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DOS FITOPATÓGENOS	19
4.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	20
4.4 ENSAIO DE PROTEÇÃO DE PLANTAS	21
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS	22
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 ENSAIOS DE ATIVIDADES ANTIMICROBIANA	22
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

A própolis consiste em uma resina complexa que as abelhas podem coletar de várias plantas, elaboram e depositam em suas colmeias (LONGHINI et al., 2007). As abelhas utilizam a própolis para vedar frestas, recobrir superfícies irregulares e eventuais invasores. A própolis também protege a colônia de doenças devido a suas propriedades antimicrobianas.

Um aspecto importante do conhecimento sobre a própolis é o fato de que, embora a própolis tenha sido alvo de numerosos estudos por suas propriedades terapêuticas e farmacológicas, ainda encontra-se poucas pesquisas sobre o potencial da própolis na proteção de plantas e seu efeito sobre a planta. A própolis mais conhecida e estudada é a obtida da abelha de ferrão *Apis mellifera*. No entanto, a própolis também pode ser obtida de abelhas sem ferrão, como a *Tetragonisca angustula*, que é uma das espécies de ampla distribuição é muito comum tanto em propriedades rurais como urbanas. Alguns trabalhos têm demonstrado o efeito antimicrobiano da própolis obtida de *A. mellifera* sobre agentes fitopatogênicos (JASKI et al., 2019) mas a de *T. angustula* ainda é menos conhecida e estudada.

As informações sobre o efeito de própolis na aplicação em plantas são ainda mais restritas. Entre os poucos trabalhos nesse sentido, Pereira et al. (2008) indicaram potencial do extrato etanólico de própolis no controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro.

Na cultura do tomateiro, cultura comumente muito afetada por diversas doenças (INOUE-NAGATA et al., 2016) e onde o controle dessas doenças leva muitas vezes ao uso abusivo de agrotóxicos, alguns trabalhos já têm mostrado o potencial de alguns derivados de plantas como alternativa no controle dessas doenças (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000; FIORI et al., 2000), porém ainda pouco se sabe do efeito da própolis.

Diante do conhecimento do uso de preparados a partir da própolis de abelhas ainda ser limitado, torna-se muito importante avaliar e compreender o potencial uso da própolis para sanidade das plantas. Assim, é relevante analisar e disponibilizar informações científicas sobre o emprego da própolis sobre fitopatógenos, considerando que menos ainda se sabe do potencial uso da própolis de *Tetragonisca angustula* e seus potenciais efeitos na proteção de plantas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula* no controle de fitopatógenos causadores de doenças do tomateiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de própolis sobre fitopatógenos do tomateiro.

-Avaliar o efeito do extrato etanólico de própolis no controle de doenças em plantas de tomateiro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TOMATE

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais utilizadas na culinária brasileira e de excelente aceitação por parte dos consumidores. Tem diversas finalidades é amplamente difundida pelo mundo e ocupa a terceira maior área plantada dentre as hortaliças cultivadas em território brasileiro é uma das principais hortaliças produzidas no Brasil (MADEIRA, 2019).

A cultura do tomateiro possui grande importância socioeconômica no Brasil, sendo explorada ao longo de todo o ano, em sistemas de produção diversificados, cuja produção de frutos pode ser destinada ao consumo in natura (mercado de mesa) ou ao processamento industrial. O tomateiro é cultivado de forma intensiva em campo aberto ou em estufas, conduzido com tutoramento ou não (rasteiro), envolvendo tanto o modelo de produção tradicional (convencional) como o orgânico. (FILHO,2022)

3.2 DOENÇAS DO TOMATEIRO

As doenças do tomateiro têm representado grande limitação à produção nacional de frutos, em quantidade e qualidade, que satisfaçam às necessidades do produtor e dos consumidores. São causadas por fatores bióticos (por exemplo, fungos, oomicetos, bactérias, nematoides e vírus), ou podem ser de origem abiótica, ou distúrbios fisiológicos, provocados por excesso ou deficiência mineral, fitotoxicidade de produtos químicos, desbalanço hídrico, entre outros (ZAMBOLIM, 2022). Diversas doenças de importância têm sido de ocorrência comum na cultura do tomateiro (INOUE-NAGATA et al., 2016).

3.3 PINTA PRETA OU MANCHA DE *ALTERNARIA*

A pinta-preta apresenta alto potencial destrutivo com incidência sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos, ocasionando elevados prejuízos econômicos. O aumento de suscetibilidade à doença está geralmente associado a tecidos maduros com maior frequência durante a fase de frutificação (PEREIRA et al., 2013)

Nas folhas são observadas lesões necróticas de coloração marrom escura a preta, com bordos bem definidos, podendo ser mais ou menos circulares, elípticas ou irregulares e apresentar halo amarelado. Lesões da pinta-preta lembram um alvo de tiro, devido à presença de anéis concêntricos em sua parte central (BALBI-PEÑA et al., 2006). Com o progresso da doença, as lesões aumentam rapidamente em tamanho e em número com a destruição total das folhas pelo coalescimento das lesões. Quando estas atingem as nervuras impedem a circulação de seiva pelos tecidos. A diminuição da área foliar expõe os frutos a queimaduras pelo sol, tornando-os impróprios para a comercialização (PEREIRA et al., 2013)

Nos frutos, as lesões são consideravelmente maiores, escuras e deprimidas, onde se observa a presença típica de anéis concêntricos, que geralmente se localizam na região peduncular. Normalmente os frutos atacados caem no solo, e podem servir de fonte de inóculo. Manchas pardo-escuras também podem ser observadas nos pedicelos e cálices das flores e frutos infectados. Em condições de alta temperatura e umidade, as lesões são recobertas por micélio e frutificações do patógeno de aspecto escuro e aveludado (ZAMBOLIM, 2022).

3.4 SEPTORIOSE

A septoriose é causada por um fungo (*Septoria lycopersici*) que ocorre em qualquer fase de desenvolvimento do tomateiro. Os sintomas são observados inicialmente nas folhas baixas, na forma de pequenas e numerosas manchas encharcadas, de formato mais ou menos circular e elíptico, medindo de 1 a 3 mm de diâmetro. À medida que a doença se desenvolve nas plantas, as lesões passam a adquirir coloração marrom, acinzentada no centro e apresentam bordas escurecidas, com um estreito halo amarelado, podendo atingir 5 mm de diâmetro (INOUE-NAGATA et al., 2016).

No centro das lesões, quando em condições de alta umidade, observa-se a presença de pequenos pontos pretos, que consistem em frutificações do patógeno (picnídios). Lesões menores, escuras e sem a presença de halos amarelados podem ocorrer no caule, hastes, pecíolo, cálice e flores de plantas afetadas, raramente nos frutos. Com o tempo a doença progride de forma ascendente na planta, com início nas folhas baixas em direção às folhas mais novas. As lesões coalescem, as folhas amarelam, secam e caem, causando desfolha acentuada das plantas. Em consequência, plantas severamente afetadas produzem frutos menores, sujeitos à queimadura pela exposição direta aos raios solares (ZAMBOLIM, 2022).

3.5 MANCHA BACTERIANA

A cultura do tomateiro pode ser afetada por diferentes espécies de bactérias fitopatogênicas. A mancha bacteriana é uma das principais doenças em cultivos de tomateiro em campo aberto (INOUE-NAGATA et al., 2016). Os sintomas da mancha bacteriana causada pela bactéria *Xanthomonas vesicatoria*, nas mudas podem se manifestar nos cotilédones e, assim como nas folhas, inicialmente se revelam como pequenas áreas de aspecto encharcado (anasarca). Essas áreas progridem para lesões marrons de formato irregular, que também ocorrem nas bordas das folhas, que podem apresentar clorose. Com a coalescência das lesões, ocorre seca generalizada das folhas, comprometendo a área fotossintetizante da planta, levando à redução da produção. As lesões podem se formar também em outras partes aéreas da planta, como hastes, pedúnculos, flores, sépalas e frutos. Nos frutos os sintomas se iniciam

como áreas menores esbranquiçadas , que se confundem com os do cancro bacteriano, mas tornam-se corticosos com o tempo (ZAMBOLIM, 2022).

3.5 MOFO BRANCO

O mofo branco é causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e representa uma importante doença do tomateiro no Brasil. O fungo é favorecido por temperaturas amenas e umidade elevada e ainda não há cultivares resistentes à doença (ZAMBOLIM, 2022). O mofo branco é uma doença de difícil controle e que pode afetar várias espécies de plantas cultivadas (KIMATI et al, 2005).

Os sintomas se iniciam com a destruição do tecido do caule de aproximadamente 10 a 15 cm do solo, o que provoca o surgimento de lesões aquosas, que se formam devido à destruição de componentes da parede celular por enzimas, celulases, hemicelulases e pectinases. As lesões apresentam tamanho variável, podendo levar à constrição completa da haste; o tecido se torna necrótico e dificulta a passagem de água e nutrientes, o que repercute em murcha e seca da parte aérea. Lesões avançadas no caule apresentam coloração palha a esbranquiçada (ZAMBOLIM, 2022).

Com a evolução da doença, os ramos são colonizados pelo patógeno, o conteúdo interno dos ramos é destruído, onde se formam escleródios após 7 ou 10 dias da infecção. Os escleródios são estruturas de resistência constituídas pelo enovelamento de hifas e que permitem a sobrevivência do fungo por longos períodos no solo (INOUE-NAGATA et al., 2016). Em condição de elevada umidade do solo e do ar, sinais do patógeno (micélio branco cotonoso e escleródios) podem se desenvolver sobre as áreas lesionadas. Os frutos, quando atacados, se rompem rapidamente, exibindo podridão aquosa, com possível frutificação de estruturas do patógeno na superfície (ZAMBOLIM, 2022).

3.6 ABELHA JATAI

As abelhas sem ferrão são agrupadas na superfamília *Apoidea* e são popularmente conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (NOGUEIRA-NETO, 1997). Essas abelhas são excelentes agentes polinizadores, sendo muito utilizadas com essa finalidade em plantações e estufas (CAUICH et al., 2006). Assim, essas abelhas e outros insetos são essenciais para a manutenção da biodiversidade e equilíbrio da maioria dos ecossistemas terrestres (STUCHI; TAKASUSUKI; TOLEDO, 2008). Esta abelha produz mel e própolis de excelente qualidade e com muitas propriedades biológicas que devem ser estudadas.

Jataí ou mosquito-amarela (*Tetragonisca angustula*) é uma abelha muito fácil de ser encontrada, especialmente porque consegue construir seu ninho em uma grande variedade de cavidades, como dentro de tijolos em paredes construídas pelo homem. O orifício de entrada dessa espécie é constituído de um pequeno tubo de cera. Seu mel é um dos mais apreciados entre todos os meliponíneos, contudo, sua produção é muito pequena (VENTURIERI, 2008).

O mel de abelhas sem ferrão tem maior valor comercial comparado ao mel tradicional, entretanto são comercializados sem uma legislação própria. Na literatura existem poucos trabalhos que tratam da composição destes tipos de mel que são popularmente conhecidos por suas propriedades benéficas à saúde (SOUZA, 2008).

3.7 PRÓPOLIS

Própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas que coletam metabólitos secundários da flora da região, sua composição química é complexa e variada. *Tetragonisca angustula* e *Scaptotrigona bipunctata* são abelhas nativas do Brasil e popularmente conhecidas como “abelhas indígenas sem ferrão” e que também produzem própolis (FIANCO, et al., 2013).

É uma resina de ampla utilidade para as abelhas e para o homem. A composição química da própolis é complexa e está relacionada com a flora da região em que foi originada e a época da coleta. Sua atividade farmacológica tem sido

atribuída aos compostos fenólicos, entre eles flavonoides e ácidos fenólicos, cujos teores têm sido propostos como parâmetros para o controle da qualidade (BURIOL, 2009).

A própolis possui princípios ativos com várias atividades biológicas, mas grande parte dos estudos é direcionado a atividade antimicrobiana sobre patógenos de humanos. Embora escassos alguns trabalhos têm demonstrado o potencial uso da própolis de *A. mellifera* para controle de doenças de plantas (PEREIRA et al., 2008; JASKI et al., 2019), mas a própolis de *T. angustula* ainda tem sido pouco estudada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, campus de Laranjeiras do Sul-PR. Foram conduzidos ensaios em condições de laboratório e casa de vegetação.

4.1 OBTENÇÃO DO PREPARADO DE PRÓPOLIS

A própolis de *Tetragonisca angustula* foi obtida de apiários da região de Laranjeiras do Sul-PR. Para obtenção do extrato, inicialmente foi feita a retirada de impurezas, e em seguida adicionado álcool etílico P.A. 70%, sendo a proporção com base em peso/peso de própolis bruta e álcool de 16:84%, respectivamente. Após a mistura dos componentes, o extrato foi mantido em “repouso” por 15 dias, sendo a seguir filtrado em papel quantitativo e em membrana de nitrocelulose (tipo Millipore) 0,45 µm de poro com auxílio de bomba de vácuo. A partir desse extrato foram preparadas as concentrações de 0, 0,1, 0,5, 1, 2 e 3% que serão utilizadas nos bioensaios (Figura 1).

Figura 1. Preparo das concentrações de extrato etanólico de própolis para emprego nos experimentos *in vivo*.



4.2 ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DOS FITOPATÓGENOS

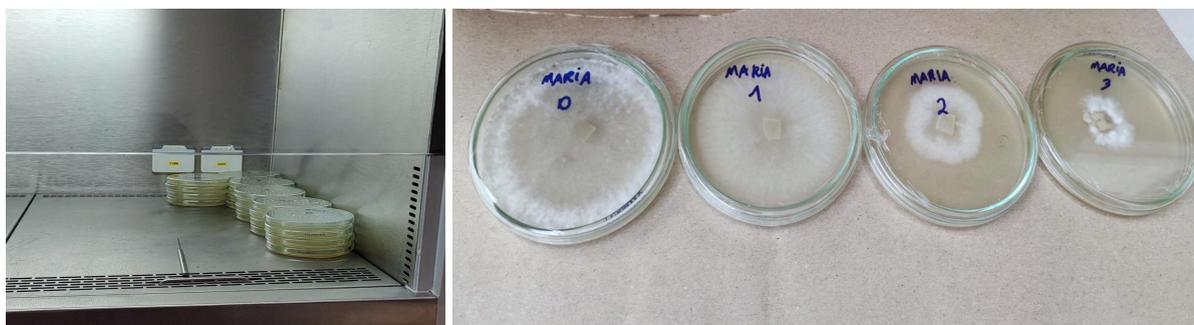
Os fungos *Alternaria solani* e *Septoria lycopersici* foram isolados a partir de folhas sintomáticas de tomateiro em meio de cultivo ágar-água a 2% em placas de Petri. Após a obtenção de culturas puras, os fungos foram transferidos para meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) em placas de Petri onde serão mantidos a 25 oC sob luz fluorescente. Para o preparo do inóculo, foram adicionados 10 mL de água destilada na placa de Petri contendo o isolado fúngico, seguido de raspagem da colônia com auxílio de alça de Drygalski. O material foi filtrado em gaze e a suspensão obtida calibrada para 1×10^4 conídios mL⁻¹ com auxílio de câmara de Neubauer. O fungo e *Sclerotinia sclerotiorum* foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Fitopatologia. Foi realizada a confirmação de cada agente causal conforme as características descritas para cada espécie.

A bactéria *Xanthomonas vesicatoria* foi isolada de folhas sintomáticas de tomateiro e cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente (5 g peptona; 3 g extrato de carne; 15 g ágar bacteriológico e 1000 mL de água destilada) e mantida a 28°C em escuro por 48 horas e foram utilizadas para preparo do inóculo. Foi a confirmação de cada agente causal conforme as características descritas para cada espécie. Para obtenção do inóculo foi preparada a suspensão bacteriana em solução salina (NaCl a 0,85%) com concentração ajustada para 1×10^8 UFC mL⁻¹, com base em curva de absorbância a 580 nm.

4.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* foi realizada através de experimento de crescimento micelial (Figura 2). Para tanto, as concentrações do extrato etanólico de própolis foram incorporadas em meio de cultura BDA antes de verter em placas de Petri. Após o meio esfriar foi transferido um disco de micélio de colônia com 10 dias de cultivo para o centro de cada placa. Quando as primeiras colônias atingiram $\frac{3}{4}$ da placa foi realizada a medida do diâmetro médio das colônias, através de duas medidas perpendiculares entre si. Para o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* também foi realizada a contagem do número de escleródios formados em cada colônia após 10 dias de cultivo.

Figura 2. Preparo e cultivo fúngico em meio de cultura BDA.



Para o experimento de atividade antimicrobiana sobre *X. vesicatoria*, tubos de ensaio estéreis (capacidade 10 mL) contendo concentrações iguais para meio de cultura caldo nutriente, receberam os tratamentos, esterilizados por filtração a frio, totalizando o volume final de 5 mL por tubo. Cada tubo recebeu 100 μ L de suspensão bacteriana com 108 UFC mL⁻¹ e foram mantidos sob agitação durante 48 horas a 27°C quando foi determinada a absorbância a 580 nm. Nesta determinação cada tratamento teve como amostra de referência (branco) uma repetição sem a bactéria.

4.4 ENSAIO DE PROTEÇÃO DE PLANTAS

Esses estudos para avaliar o efeito protetor sobre as doenças causadas por esses fitopatógenos foram conduzidos em casa de vegetação sobre a cultura do tomateiro. Para tanto, mudas de tomate cv. Santa Clara, foram produzidas em

bandejas de polietileno com substrato e aos 28 dias foram transplantadas para vasos de 3 L contendo 400 g de composto orgânico e terra corrigida conforme recomendação para a cultura de tomate (SOUZA; RESENDE, 2003).

As mudas apresentavam uniformidade, de 4 a 6 folhas sendo a quantidade ideal para uma muda de qualidade, apresentavam um bom enraizamento o qual envolvia todo o substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada, com temperatura média de 26 °C (Figura 3). Foi fornecida irrigação conforme a necessidade da cultura. Foi realizado um experimento para cada fitopatógeno. Não foi possível realizar experimento com a bactéria *X. vesicatoria* devido ao inóculo não apresentar viabilidade satisfatória no período de realização desses experimentos.

Figura 3. Experimento de proteção de plantas de tomateiro



No experimento em plantas, o extrato etanólico de própolis foi avaliado em aplicação preventiva e curativa. A aplicação preventiva foi realizada 48 horas antes da inoculação das plantas com o patógeno, e a curativa após 48 da inoculação. A aplicação foi realizada por pulverização até ponto de escorrimento. A inoculação foi realizada por aspersão 12 dias após o transplante das mudas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida (Figura 4) por 24 horas (ALFENAS; MAFIA, 2016). Após o aparecimento dos sintomas foi avaliada a severidade da doença através da porcentagem de área foliar lesionada, com auxílio de escala diagramática específica para cada doença.

Figura 4. Plantas de tomateiro mantidas em câmara úmida após inoculação com o patógeno.



4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS

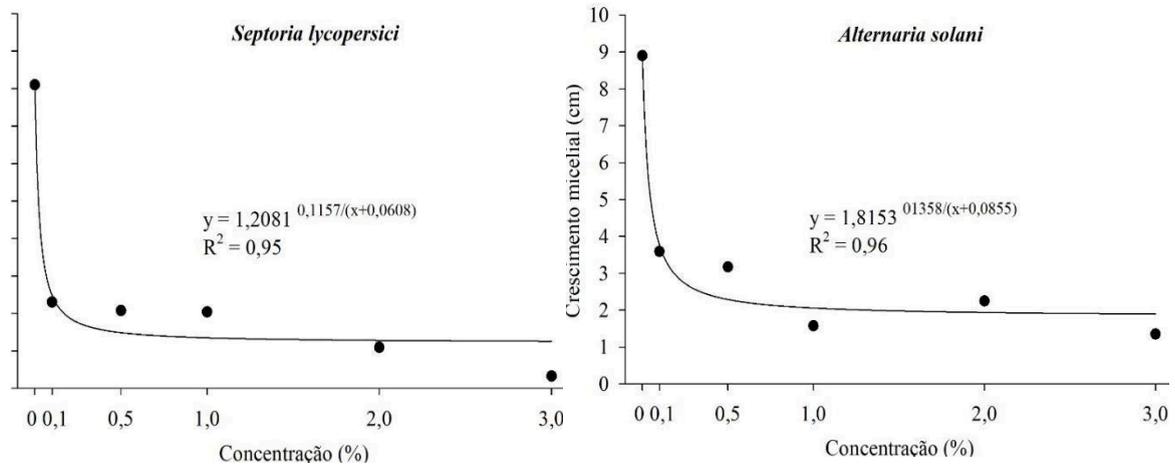
Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos a teste de normalidade Shapiro-Wilk, realizando a transformação dos dados para raiz de $x+1$ quando pertinente. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida de análise de regressão para as diferentes concentrações ou de teste de média de Tukey a 5% de probabilidade de erro quando não houve ajuste de equação, com auxílio do programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2007).

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS DE ATIVIDADES ANTIMICROBIANA

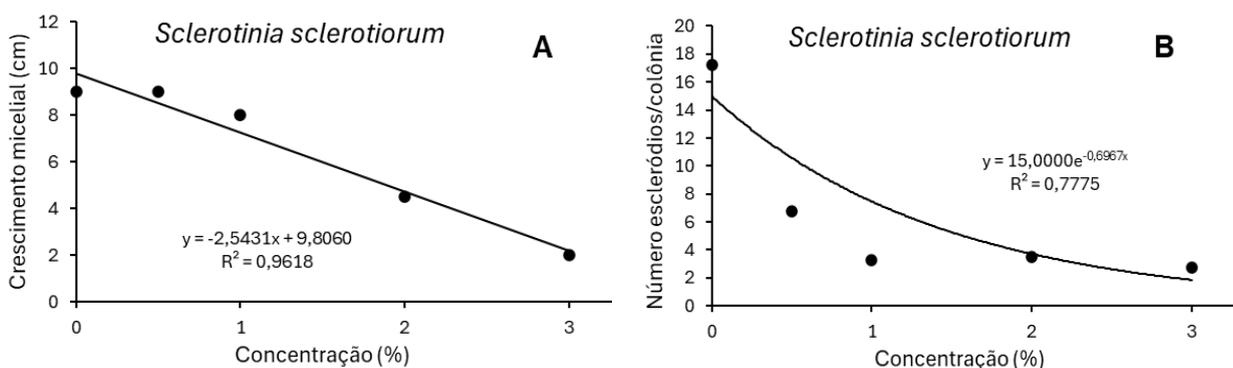
O extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula* apresentou efeito inibitório direto tanto sobre *Alternaria solani* como sobre *Septoria lycopersici* (Figura 5). Inibição expressiva já foi observada na concentração de 0,1%, sendo que na concentração de 3% foi observada redução de 84,8 e 96,0 no crescimento de *A. solani* e *S. lycopersici*, respectivamente.

Figura 5. Crescimento micelial de *Alternaria solani* e *Septoria lycopersici* sob diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis (EEP) de *Tetragonisca angustula*



Resultados semelhantes foram obtidos sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco (Figura 6). Nesse caso houve redução no crescimento micelial com o aumento da concentração do extrato de própolis utilizada, indicando efeito dose-dependente. Com a concentração de 3% do extrato de própolis a inibição foi 77,8% no crescimento em relação à testemunha sem própolis. Observou-se também redução na formação de escleródios do fungo, mesmo nas menores concentrações do extrato de própolis, no entanto não chegou a inibir totalmente a formação dessas estruturas, mesmo nas maiores concentrações.

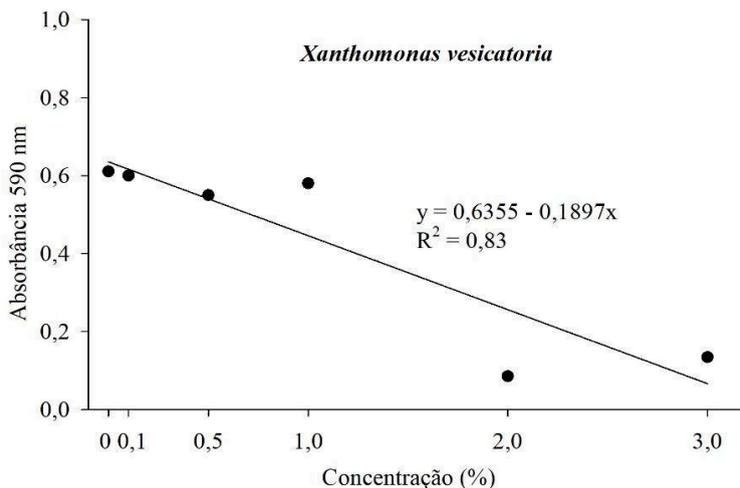
Figura 6. Crescimento micelial (A) e número de escleródios (B) formados em colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis (EEP) de *Tetragonisca angustula*



Os resultados que demonstram a inibição do crescimento micelial dos fungos é muito importante pois esse crescimento é fundamental para o sucesso da colonização da planta hospedeira pelo patógeno. A inibição da formação de escleródios de *S. sclerotiorum* também é uma informação importante pois essas são estruturas assexuais de resistência e que podem sobreviver por vários anos no solo, então essa ação do extrato de própolis pode contribuir para redução do inóculo do fungo no área.

Sobre a bactéria causadora da mancha bacteriana, *X. vesicatoria*, também houve significativa inibição na multiplicação bacteriana, com efeito linear, indicando aumento na atividade da própolis com o aumento na concentração utilizada (Figura 7).

Figura 7. Atividade antibacteriana do extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula* sobre *Xanthomonas vesicatoria*.



Esses resultados indicam que a própolis de *T. angustula* possui propriedades antimicrobianas assim como já tem sido amplamente relatada para própolis de *Apis mellifera*, sobretudo sobre patógenos de humanos (LONGHINI et al., 2007; MIORIN et al., 2003). Para própolis de *A. mellifera* já foi observado efeito também no estímulo a respostas de defesa em plantas (JASKI et al., 2019). Os resultados desse trabalho com a própolis de *T. angustula* sobre agentes causais de doenças do tomateiro demonstra potencial para controle dessas doenças, e desperta para o avanço de pesquisas nesse sentido.

5.2 ENSAIOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

No experimento com a pinta-preta, causada por *A. solani*, ocorreram poucas lesões causadas pela doença, não sendo possível estimar a severidade e comparar a

resposta em relação aos tratamentos. É possível que as condições climáticas, com clima mais ameno, possa ter contribuído para afetar a infecção, pois o patógeno geralmente assume maior importância em regiões mais quentes (INOUE-NAGATA et al., 2016). Ou então pode ter ocorrido uma redução na viabilidade do inóculo utilizado. De forma semelhante foi observado no experimento para o mofo branco, onde foi observado algum crescimento em algumas poucas plantas, não permitindo a obtenção de dados mais analíticos e conclusivos.

Para a doença septoríose a inoculação foi bem sucedida, apresentando altos valores de severidade nas plantas de tomateiro. A primeira avaliação foi realizada aos 10 dias após a inoculação, e todas as folhas inoculadas apresentavam lesões da doença. Nessa avaliação, não houve interação entre os fatores e redução na severidade pelo extrato de própolis individualmente dentro das aplicações, mas na análise das médias gerais das concentrações (fator principal) o extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula* na concentração de 3% promoveu significativa redução em relação a concentração de 0,5%, que não diferiu da testemunha sem extrato de própolis (Tabela 1 e Figura 8).

Tabela 1. Severidade da septoríose em plantas de tomateiro tratadas com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP) de *Tetragonisca angustula*

EEP (%)	10 dias após inoculação			14 dias após inoculação		
	Aplicação			Aplicação		
	Preventiva	Curativa	Média	Preventiva	Curativa	Média
0	20,8	10,2	15,5 ab	5,4	4,8	5,1
0,5	23,2	13,6	18,4 a	4,8	5,4	5,1
1	21,6	10,8	16,2 ab	6,8	3,4	5,1
2	21,6	11,6	16,6 ab	12,4	4,8	8,6
3	14,2	7,6	10,9 b	7,4	3,0	5,2
Média	20,3 A	10,8 B		7,4 A	4,3 B	
CV(%)	16,0			22,3		

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados foram transformados em raiz de $x + 1$ para análise.

Figura 8. Plantas de tomateiro afetadas pela septoriose no experimento com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP) de *Tetragonisca angustula*



Houve também diferença entre as aplicações, sendo que na média geral a aplicação curativa promoveu menores valores de severidade em relação ao tratamento preventivo. Resultado semelhante foi observado na avaliação realizada 14 dias após a inoculação, com a média da severidade das aplicações curativas com menor severidade em relação a aplicação preventiva. Nessa avaliação, no entanto, não foi observada diferença significativa entre as concentrações de própolis utilizada. Destaca-se que nessa aplicação os valores de severidade foram, de maneira geral, inferiores aos observados na primeira avaliação, isso se deve possivelmente a serem consideradas nessa avaliação folhas de tomateiro que não haviam sido inicialmente inoculadas mas que já apresentavam sintomas de reinfecções.

Observa-se que no experimento em plantas de tomateiro não foram reproduzidos os expressivos resultados promovidos pelo extrato de própolis nos experimentos de atividade direta *in vitro* sobre o crescimento dos fitopatógenos. Possivelmente tenha contribuído para isso o fato de a septoriose ter ocorrido de forma muito agressiva em função das condições favoráveis de câmara úmida após a inoculação. Também é possível que outros fatores ambientais que podem ocorrer em condições *in vivo* tenham de alguma forma contribuído para reduzir as diferenças entre

os tratamentos. Uma das dificuldades de controle da septoriose é a limitação de cultivares comerciais de tomateiro com resistência satisfatória à doença, assim a medida ainda mais utilizada é o uso do controle químico com fungicidas (INOUE-NAGATA et al., 2016).

As informações sobre o uso da própolis de *T. angustula* no controle de doenças em plantas ainda são muito escassas. Embora nesse estudo os resultados mais promissores tenham sido observados nos teste *in vitro*, foi possível verificar a atividade biológica dessa própolis, demonstrando a importância de ampliar estudos para verificar também outras formas de preparo e uso, bem como compreender possíveis mecanismos de ação.

6 CONCLUSÃO

O extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula* apresentou efeito inibitório *in vitro* sobre os fitopatógenos do tomateiro, *Alternaria solani*, *Septoria lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Xanthomonas vesicatoria* e com maior efeito em maiores concentrações. Em plantas de tomateiro o extrato etanólico promoveu poucas alterações na severidade da septoriose, embora, no geral, aplicações curativas apresentaram menores valores de severidade.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Eds.) **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016, 516p.
- BALBI-PEÑA, M.I.B. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina – II Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.4, p.401-404, 2006.
- BURIOL, L. et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico; *Química Nova*, v.32, n.2, 296-302, 2009.
- CAUICH, O. et al. Polination of habanero pepper (*Capsicum chinese*) and production in enclosures using the stingless bee *Nannotrigona perilampoides*. **Journal of Apicultural Research**. v. 45, n. 3, p. 125-130, 2006.
- INOUE-NAGATA, A. K. et al. Doenças do tomateiro. In: AMORIM, L. et al. **Manual de Fitopatologia**. Ouro Fino: Ceres. p.697-731. 2016.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR: Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.0**.Lavras: DEX/UFLA, 2007. CD-ROM. Software.
- FIANCO, A. L. B. et al. Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna).**Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 21, p. 01-112, jan./jun. 2013.
- FILHO, Michereff, M. et al (2022). **Manejo integrado de pragas do tomate para mesa**. Embrapa Hortaliças. 57 p. Brasília, DF. 2022
- FIORI, A.C.G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v.148, n.7-8, p.483-487, 2000.
- JASKI, J. M. et al. Green propolis ethanolic extract in bean plant protection against bacterial diseases. **Ciência Rural**, v.49, n.6, 2019.
- KIMATI, H. et al. (Eds) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 2005. 663p.
- LONGHINI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 388-395, 2007.
- MADEIRA, N. R, et al. (2019). **Cultivo do tomateiro em Sistema de Plantio Direto de Hortaliças (SPDH)**. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. Circular Técnica 168.

MIORIN, P. L. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913–920, nov. 2003.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: **Nogueirapis**, 1997

PEREIRA, C. S. et al. Controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro com extrato etanólico de própolis. **Revista ceres**, v. 55, n. 5, p. 369-376, 2008.

PEREIRA, R. B., CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. **Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto** (Comunicado Técnico, 95). Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. 2013.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV. 2001, 279p.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. et al. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 129-137, 2000.

SOUZA, G. L. **Composição e qualidade de méis de abelhas (*Apis mellifera*) e méis de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*)**. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 2008, 86 pg.

SOUZA, J. L. de; RESENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 837 p.

STUCHI, A. L. P. B.; TAKASUSUKI, M. C. C. R.; TOLEDO, V. A. A. Análise da genética de populações em abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille) por meio de isoenzimas. **Magistra**, v. 20, n. 1, p. 68-77, 2008.

VENTURIERI, G. C. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão** / Giorgio Cristino Venturieri. - 2. ed. rev. atual. - Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008

ZAMBOLIM, L.; QUEZADO-DUVAL, A. M. **Produção integrada do tomateiro tutorado: subsídios para produção integrada**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Coordenadoria de Educação Aberta e a Distância, 2022. 315 p.