



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

**FÁBIO JUNIOR TELAXKA**

**EXTRATO AQUOSO E BIOFERMENTADOS DE FUMO-BRAVO (*Solanum mauritianum* Scop) NA PROTEÇÃO DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM**

**LARANJEIRAS DO SUL  
2015**

**FÁBIO JUNIOR TELAXKA**

**EXTRATO AQUOSO E BIOFERMENTADOS DE FUMO-BRAVO (*Solanum mauritianum* Scop) NA PROTEÇÃO DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Profº Dr. Gilmar Franzener

**LARANJEIRAS DO SUL**  
**2015**

FÁBIO JUNIOR TELAXKA


**EXTRATO AQUOSO E BIOFERMENTADOS DE FUMO BRAVO (*Solanum  
mauritianum*) NA PROTEÇÃO DO FEIJOEIRO AO CRESTAMENTO  
BACTERIANO COMUM**

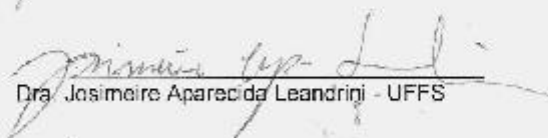
Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Gilmar Franzener

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:  
16/12/2015

BANCA EXAMINADORA:

  
Dr. Gilmar Franzener - UFFS

  
Dra. Josimeire Aparecida Leandrin - UFFS

  
Dra. Gabriela Silva Moura - UFFS

## RESUMO

A espécie de fumo-bravo (*Solanum mauritianum*) é tipicamente pioneira, abundante na Floresta Estacional Decidual da Mata Atlântica. Embora lhe sejam atribuídas propriedades medicinais, pouco se sabe de seu efeito sobre doenças de plantas. Assim, esse trabalho teve por objetivo avaliar o extrato aquoso (EA) e biofermentados no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, avaliação da severidade, na indução de fitoalexina em feijoeiro e de enzimas de defesa, a polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase. O experimento foi conduzido em laboratório e casa de vegetação, utilizando a variedade IPR-Tuiuiu. Os extratos aquosos de fumo-bravo (EA) foram avaliados nas concentrações: 1; 5; 10 e 15% e 20%. Os biofermentados de fumo-bravo com e sem a adição de açúcar mascavo a 3% foram testados com 5, 10, 15 e 20 dias de fermentação, tendo como testemunha água destilada. Foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* sobre a bactéria, indução da fitoalexina faseolina, o efeito local e sistêmico sobre a severidade da doença em plantas de feijoeiro e a indução das enzimas polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. O extrato aquoso (EA) de fumo-bravo induziu a síntese de faseolina. Os biofermentados reduziram significativamente o crescimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* mas o extrato aquoso promoveu estímulo. O extrato aquoso e o biofertilizante com adição de açúcar mascavo reduziram a severidade do cretamento bacteriano em folhas tratadas. O extrato aquoso e o biofermentado com 15 e 20 dias com adição de açúcar mascavo induziram a atividade das enzimas polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, sendo que para essa última também de forma sistêmica. Esses resultados indicam o potencial de derivados de fumo-bravo na proteção de plantas de feijoeiro ao cretamento bacteriano comum.

Palavras-chave: Feijoeiro. Fitoalexinas. Polifenoloxidase. Fenilalanina amônia-liase. Mecanismos de defesa. Controle alternativo.

## ABSTRACT

A sort of smoke-bravo (*Solanum mauritianum*) is typically pioneer, abundant in Deciduous Forest of the Atlantic. While you are attributed medicinal properties, little is known about its effect on plant diseases. Thus, this study aimed to evaluate the aqueous extract (EA) and biofermentados in control of bacterial blight common bean, caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, assessment of severity, the phytoalexin induction in bean and defense enzymes, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase. The experiment was conducted in laboratory and greenhouse conditions using the IPR-Tuiuiu variety. The aqueous extracts of tobacco-bravo (EA) were evaluated at concentrations of 1; 5; 10 and 15% and 20%. Smoke-Bravo biofermentados with and without addition of 3% and brown sugar were tested at 5, 10, 15 and 20 days of fermentation, with distilled water as a control. Antimicrobial activity tests were performed in vitro on bacteria, induction of phytoalexin phaseolin, local and systemic effect on the severity of disease in bean plants and the induction of polyphenol oxidase enzymes and phenylalanine ammonia lyase. The tests were conducted in a completely randomized design with four replications. The aqueous extract (EA) smoke-induced brave phaseolin synthesis. The biofermentados significantly reduced the growth of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* but the aqueous extract promoted stimulus. The aqueous extract and bio-fertilizer with adding brown sugar reduced the severity of bacterial blight on treated leaves. The aqueous extract and biofermentado with 15 and 20 days with the addition of brown sugar induced the activity of polyphenol oxidase enzymes and phenylalanine ammonia-lyase, and for the latter also systemically. These results indicate the potential for smoke-mad derivatives in bean plants to protect the common bacterial blight.

Keywords: Bean. Phytoalexins. Polyphenoloxidase. Phenylalanine ammonia-lyase. Defense mechanisms. Alternative control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Folhas de fumo-bravo utilizadas nos experimentos.....	23
Figura 2 - Folhas de fumo-bravo picadas e submetidas à fermentação.....	24
Figura 3 - Folha sintomática de feijoeiro utilizada no isolamento da bactéria.....	25
Figura 4 - Placa de Petri contendo o inóculo da bactéria.....	25
Figura 5 - Placas de Petri contendo os hipocótilos tratados.....	26
Figura 6 - Amostra de tecido foliar macerada em almofariz de porcelana.....	29
Figura 7 - Teor de faseolina em feijoeiro com uso de extrato aquoso (EA) de fumo-bravo em diferentes concentrações.....	31
Figura 8 - Teor de faseolina em feijoeiro por biofermentados de fumo-bravo com e sem a adição de açúcar mascavo em diferentes tempos de fermentação.....	32
Figura 9 - Efeito antibacteriano dos biofermentados de fumo-bravo com e sem a adição de açúcar mascavo sobre <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .....	33
Figura 10 - Efeito antibacteriano de extrato aquoso (EA) de fumo-bravo em diferentes concentrações sobre <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .....	34
Figura 11- Atividade da polifenoloxidase com a utilização de fermentados de fumo-bravo sem adição de açúcar mascavo após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.....	37
Figura 12 - Atividade da polifenoloxidase com a utilização de fermentados de fumo-bravo com adição açúcar após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.....	38
Figura 13 - Atividade da polifenoloxidase com a utilização de extrato aquoso (EA) de fumo-bravo após 72 horas na 1ª (tratada) e 2ª (não tratada) folha trifoliada.....	39
Figura 14 - Atividade da fenilalanina amônia-liase com a utilização de fermentados de fumo-bravo sem açúcar após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.....	40
Figura 15 - Atividade da fenilalanina amônia-liase com a utilização de fermentados de fumo-bravo com adição de açúcar mascavo após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.....	41
Figura 16 - Atividade da fenilalanina amônia-liase com a utilização de extrato aquoso (EA) de fumo-bravo após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.....	42

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida, pela saúde, pelas graças quem têm concedido à cada dia e por ter me capacitado à tornar realidade essa conquista em minha vida.

A meus pais Floriano Telaxka e Valéria Telaxka pelo amor e apoio incondicional durante toda a minha existência. Pelo amparo e ajuda incessante quando precisei e também, por acreditarem em mim, na minha capacidade e vontade de chegar até o fim de mais uma etapa de vida.

Aos meus irmãos Francinaldo Telaxka, Sergio Telaxka e Jean Marcos Telaxka pelo apoio, pela amizade e pela união.

A minha namorada Nilva Bortoluzzi pelo apoio, compreensão, carinho e companheirismo. Estando presente nas horas boas e ruins.

Ao professor orientador Dr<sup>o</sup>. Gilmar Franzener pela oportunidade, pela orientação, paciência, atenção e valiosos ensinamentos passados durante a graduação e orientação, pelo seu profissionalismo, pela ajuda incessante e pela sua grande amizade.

Aos meus amigos que de alguma forma contribuíram para a minha formação, principalmente aos amigos do Laboratório de Fitopatologia: Jonas Marcelo Jaski, professora Dr<sup>a</sup> Gabriela da Silva Moura, Jessica Taís Gebauer e Daniele Sheffer, onde sempre estavam de braços abertos para dar apoio, para ajudar quando fosse preciso.

Aos professores da banca de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), professora Dr<sup>a</sup> Josimeire Leandrini e professora Dr<sup>a</sup> Gabriela da Silva Moura, pelas contribuições feitas a fim de melhorar minha vida pessoal e profissional.

Aos técnicos do laboratório de Fitopatologia pela ajuda e suporte técnico quando necessário.

Aos guardas pela compreensão e profissionalismo.

## Sumário

<b>i LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1 OBJETIVOS .....	11
1.1.1 Objetivo geral .....	11
1.1.2 Objetivos específicos .....	11
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO .....	12
2.2 CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO .....	13
2.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS .....	15
2.3.1 Indução de resistência .....	16
2.3.2 Controle alternativo do crestamento bacteriano comum do feijoeiro .....	19
2.4 FUMO-BRAVO .....	20
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 OBTENÇÃO DO BIOFERMENTADO DE FUMO-BRAVO .....	23
3.2 ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DO FITOPATÓGENO .....	24
3.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	25
3.4 ENSAIO DE INDUÇÃO DE FITOALEXINAS .....	26
3.5 ENSAIO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO .....	27
3.6 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA EM PLANTAS DE FEIJOEIRO.....	28
3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	30
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
4.1 INDUÇÃO DE FASEOLINA EM FEIJOEIRO.....	31
4.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SOBRE <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .....	32
4.3 AVALIAÇÃO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO.....	35
4.4 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA.....	37
4.4.1 Atividade da Polifenoloxidase (PFO).....	35
4.4.2 Atividade da Fenilalanina amônia-liase (FAL).....	38
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes componentes da dieta alimentar do brasileiro, por ser reconhecidamente uma excelente fonte proteica e por possuir bom conteúdo de carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e compostos fenólicos com ação antioxidante que podem reduzir a incidência de doenças (ABREU, 2005).

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, onde este tem grande importância tanto na questão alimentar, quanto na questão econômico-social do brasileiro, devido principalmente, à mão-de-obra empregada durante o ciclo da cultura. Estima-se que são utilizados, somente em Minas Gerais, na cultura do feijão, cerca de sete milhões de homens por dia-ciclo de produção, envolvendo cerca de 295 mil produtores (ABREU, 2005). Assim sendo, as doenças causadas por vírus, bacterias, fungos e nematoides são um dos principais limitantes de altos rendimentos da cultura (BIANCHINI et al., 2005).

Dentre os problemas fitossanitários do feijoeiro, o crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (DÍAZ et al., 2001), é a principal doença bacteriana da cultura no Brasil. É uma bacteriose que provoca redução na colheita de 10 a 70% em condições de ataque natural (DÍAZ, 2000).

Sendo uma doença de difícil controle, o método mais eficiente para minimizar seus efeitos negativos à cultura do feijoeiro e conseqüentemente a produção, é a utilização de variedades resistentes e sementes sadias. É de fundamental importância também, a eliminação de plantas hospedeiras próximas à área de cultivo como a guanxuma (*Sida rhombifolia*) e a ervilhaca (*Vicia sativa*). Embora a eficácia do controle químico do crestamento bacteriano comum do feijoeiro ter sido de pouca magnitude nas lavouras, através de pulverização das plantas com produtos bactericidas, este é ainda o método mais utilizado para o controle dessa doença (VIGO et al., 2009). Além disso, a utilização de defensivos químicos muitas vezes acarreta uso indiscriminado, podendo levar a resistência dos fitopatógenos a determinado princípio ativo ou mecanismo de ação.

Em função dos malefícios ambientais e a saúde humana ocasionada pelo uso excessivo dos produtos químicos, torna-se importante pesquisar alternativas a fim de melhorar e ampliar as medidas de controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro. Nesse trabalho serão estudados de biofermentados e extrato aquoso de

fumo-bravo (*Solanum mauritianum*) como alternativa. Esta é uma planta pioneira e robusta, pertencente a família das Solanaceas, com ocorrência bastante comum na Mata Atlântica, na Floresta Ombrófila Mista e Densa e na Floresta Estacional Decidual e Semidecidual.

Há relatos de uso do fumo bravo (*S. mauritianum*) no combate de ectoparasitoses como carrapatos em bovinos (BEZERRA, 2014). Também, Minello (s.p.), verificou que o fermentado a base de fumo-bravo, após 14 dias de experimento, inibiram 100% do fitopatógeno *Botrytis cinerea* nas concentrações 20 e 40%.

No entanto, as pesquisas e resultados de aplicações práticas referentes ao uso desta planta nos sistemas produtivos ainda estão escassos. Sendo que está é uma planta bastante comum na região de Laranjeiras do Sul e que por sua vez, de fácil obtenção pelos produtores.

Portanto, acredita-se que derivados de fumo-bravo possam representar uma importante alternativa no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro, podendo ser utilizado em sistemas de cultivo agroecológicos, contribuindo assim, para a sustentabilidade dos agroecossistemas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Verificar o potencial do extrato aquoso e de biofermentados de *Solanum mauritianum* na proteção de feijoeiro ao cretamento bacteriano comum

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Verificar *in vitro* a atividade antibacteriana do extrato aquoso e de biofermentados de fumo-bravo sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*;
- b) Avaliar o efeito do extrato aquoso e de biofermentados de fumo-bravo na indução da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro;
- c) Avaliar o efeito de extrato aquoso e de biofermentados de fumo-bravo no controle da *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas de feijoeiro conduzidas em casa de vegetação.
- d) Avaliar o efeito do extrato aquoso e de biofermentados de fumo-bravo na indução de enzimas de defesa do feijoeiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijão está entre os alimentos mais antigos da humanidade, onde achados arqueológicos apontam para a existência de feijoeiros domesticados à cerca de 10.000 a.C. Sua disseminação pelo mundo é atribuída por muitos historiadores em decorrência das guerras, uma vez que esse alimento fazia parte essencial da dieta dos guerreiros em marcha. Grandes exploradores também ajudaram à difundir o uso e o cultivo de feijão para as mais remotas regiões do planeta (MAPA, 2014).

O feijoeiro comum (*P. vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*. É uma planta herbácea, dicotiledônea da família Fabaceae, podendo apresentar hábito de crescimento determinado ou indeterminado e ciclo de vida com variação de 60 a 120 dias. Considerando todos os gêneros e espécies de feijão englobadas nas estatísticas da FAO, publicadas em 2005, a produção mundial de feijão situou-se em torno de 18,7 milhões de toneladas, ocupando uma área de 26,9 milhões de ha. Os países em desenvolvimento respondem por 89,2% da produção mundial, sendo o continente asiático o maior produtor, com 45,7%, seguido dos continentes americanos (36,7%), africano (13,9%), europeu (3,4%) e Oceania (0,2%) (WANDER, 2005).

Sua importância está no fato de representar uma importante fonte protéica na dieta humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, o feijão é um dos componentes básicos da dieta alimentar da população e importante fonte de proteína para as classes economicamente menos favorecidas. O consumo *per capita* de feijão, na década de 70, era de 18,5 kg<sup>-1</sup> hab<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>; já em 2002 baixou para 16,3 kg<sup>-1</sup> hab<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (WANDER, 2005).

De acordo com Yokoyama (2003), o cultivo dessa leguminosa é bastante difundido em todo o território nacional, no sistema solteiro ou consorciado com outras culturas. É reconhecida como cultura de subsistência em pequenas propriedades, muito embora tenha havido, nos últimos 20 anos, crescente interesse de produtores de outras classes, adotando tecnologias avançadas, incluindo a irrigação e a colheita mecanizada.

Mundialmente, mais de metade (54,4%) da produção é originária de quatro países. Brasil e Índia são os principais produtores mundiais e em 2010 a Índia ocupou a primeira posição em área plantada com 10 milhões e 800 mil ha (EPAGRI, 2012).

De acordo com os dados da CONAB (2013) a respeito da safra 2012/2013, a área total plantada de feijão no Brasil, considerando-se primeira, segunda e terceira safras, foi de aproximadamente 3.188 milhões de hectares. A produção em todo o país foi de 3.283 milhões de toneladas, 12,5% a mais do que a safra passada.

A nível de Estado, o Paraná é o principal produtor de feijão do Brasil, obtendo uma produção de 722,9 mil toneladas em 433,6 mil hectares de área plantada na safra 2012/2013. Dessa forma ocorreu um aumento de 6,6% em relação à safra passada. A produtividade foi de 1.667 kg/ha, sendo que na safra passada foi de 1.408 kg/ha. O Paraná obteve maior produtividade em menor área plantada (CONAB, 2013).

O Paraná participa das três safras do feijão, 1ª) das águas, que começa a ser plantada em agosto; 2ª) das secas, sendo que o plantio vai de janeiro até março; e 3ª) do inverno, que tem seu plantio a partir do mês de maio até julho, esta safra é cultivada nas regiões norte e nordeste do Estado. A primeira e a segunda safras são as principais no Paraná, com participação girando em torno dos 86% e 12% da produção do Estado, respectivamente (LOLLATO; SEPULCRI; DEMARCHI, 2001).

## 2.2 CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO

O feijoeiro pode ser afetado por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematoides, as quais contribuem para o seu baixo rendimento em todas as regiões do mundo onde é cultivado (BIANCHINI et al., 2005).

Dentre estes problemas fitossanitários, os agricultores têm se preocupado com a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, agente causal do crestamento bacteriano comum, que possui grande importância para a cultura devido sua distribuição quase generalizada, e os danos severos na produtividade (VIGO et al., 2009).

As bactérias vêm apresentando importância dentro das espécies de expressão econômica no Brasil, devido à gravidade nas culturas, facilidade de

disseminação, além de dificuldades no controle (SILVA; PASCHOLATI; BEBENDO, 2007).

Segundo Wallen e Jackson (1975), danos de 38% e 45% já foram relatados. Sendo que Goodwin (1992) considera que a redução da eficiência fotossintética das plantas doentes é a causa principal dos danos causados pela doença. Sua incidência ocorre principalmente nas regiões úmidas e quentes, sendo problema nos Estados brasileiros do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, principalmente na safra das águas (KIMATI et al., 2005). Sendo que temperaturas entre 20 a 30°C e a alternância entre períodos de chuva e estiagem podem potencializar o ataque e a disseminação do patógeno (MAHUKU et al., 2006).

O crestamento bacteriano comum ocasiona lesões por toda a parte aérea da planta, sendo os sintomas mais visualizados nas folhas, onde observa-se a ocorrência de lesões secas e quebradiças, rodeadas por um halo amarelo. Sua propagação se dá principalmente através das sementes, além de restos culturais servirem como fonte do inóculo. Outras formas de disseminação são as chuvas, ventos, irrigação e insetos vetores da bactéria (EMBRAPA, 2005).

De acordo com informações da Embrapa (2005), o controle da doença pode ser realizado a partir de práticas culturais (como sementes saudáveis), produtos químicos ou resistência genética. Um exemplo de cultivar resistente ao crestamento bacteriano comum é a BRS Esplendor pertencente ao grupo comercial preto (EMBRAPA 2013). O controle químico muitas vezes é considerado a única medida eficiente e viável economicamente para que se obtenha alta produtividade e qualidade da produção (KIMATI et al., 2005), não vem apresentando boa eficácia em virtude da baixa eficiência que estes possuem. Além disso, a utilização indiscriminada de agrotóxicos pode selecionar isolados resistentes de fitopatógenos ao princípio ativo usado, bem como ocasionar contaminação do meio ambiente e dos alimentos (GHINI; KIMATI, 2000).

O uso de sementes saudáveis é fundamental para o controle da doença. No entanto, a maioria das variedades cultivadas no Brasil são susceptíveis à bacteriose. Outro problema, é a utilização de sementes próprias contaminadas pela bactéria, como ocorre nas pequenas unidades de produção familiar, o que permite a sobrevivência da bactéria e sua disseminação de um cultivo para outro (KIMATE et al., 2005).

A *X. axonopodis* pv. *phaseoli* sobrevive de 2 a 15 anos em sementes, interna ou externamente no estado hipobiótico, permanecendo patogênica. Estudos no Paraná concluíram que em restos culturais da superfície, a bactéria sobreviveu períodos variando entre 45 e 180 dias. Em folhas enterradas (15 cm), o patógeno sobreviveu de 30 a 90 dias (BIANCHINI et al., 2005).

Abordam Bianchini et al. (2005), que as plantas espontâneas hospedeiras também servem para a sobrevivência da bactéria, tais como: *Acalypha aloperoides*, *Ambrosia artemisifolia*, *Amaranthus* spp., *Chenopodium album*, *Cyperus rotandus*, *Physalis* sp., *Portulaca oleraceae*, *Sida rhombifolia* e *Vicia sativa*.

### 2.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS

O desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças de plantas tem por finalidade oferecer alternativas para se diminuir a dependência dos agrotóxicos e contribuir para se praticar uma agricultura que seja mais adequada às novas exigências de qualidade ambiental e de qualidade de vida da sociedade moderna (BETTIOL, 2015).

Bettiol (1991) relata que um dos enfoques da agricultura alternativa são os métodos alternativos de controle de doenças em plantas, o qual inclui o controle biológico, a indução de resistência e o uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência. Esses métodos praticamente eliminam os riscos de contaminação ambiental, os riscos à saúde humana e animal, causam menor impacto na biodiversidade e geram menores desequilíbrios biológicos por praticamente não interferirem nas populações não-alvo (BETTIOL, 2015).

Produtos alternativos demonstram ser eficientes no controle de doenças em plantas pela sua ação microbiana direta, como por exemplo, Piva (2013) verificou que o extrato de canola macerado na concentração de 12% foi eficiente na redução de mais de 50% de incidência e mais de 90% de severidade da doença do oídio no pepineiro. Inibição satisfatória do crescimento micelial do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do mamoeiro, foi obtida com o uso dos extratos de folhas de erva cidreira e de sementes de graviola (FERREIRA, 2013). Ou também, pela sua ação indireta, ativando mecanismos de defesa nas plantas através da indução de resistência (BRAND et al., 2010).

### 2.3.1 Indução de resistência

A resistência da planta a um determinado patógeno é definida como sendo a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada de um microrganismo em seu interior, bem como criar condições adversas para a colonização de seus tecidos pelo mesmo (PASCHOLATI, 1995). De acordo com Bonaldo et al. (2005), a resistência natural de plantas à patógenos baseia-se em barreiras e mecanismos de defesa já existentes, independente da chegada do patógeno ao sítio de infecção.

No entanto, as plantas possuem outros mecanismos de defesa, ainda mais eficientes que, aparentemente, permanecem inativos ou latentes, sendo acionados ou ativados após serem expostos aos agentes de indução (BONALDO et al., 2005). Esses mecanismos são geneticamente determinados e sua efetividade mostra-se dependente da expressão dos mesmos no momento certo, magnitude adequada e em uma sequência lógica, após o contato do patógeno com o hospedeiro (STADNIK, 2000).

A indução de resistência (IR) resulta da interação de uma planta com um adequado agente indutor. Esses indutores podem ser muito diversificados. Entretanto, em todos os casos, a interação com o agente indutor ou eliciador resulta na expressão de defesas e no *priming* (pré-condicionamento) dos tecidos saudáveis, para responder rapidamente à infecção (HAMMRSCHMIDT, 2007), aumentando a capacidade de defesa da planta contra um amplo espectro de patógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

A indução de resistência é um processo dinâmico, baseado em barreiras estruturais e bioquímicas da planta, induzida por inoculação prévia ou concomitante com um indutor. Os indutores são microrganismos saprofitos, metabólitos microbianos, extratos de plantas, agentes químicos, entre outros (MANANDHAR et al., 1998).

O estado induzido da resistência é demonstrado por um aumento na síntese de produtos de defesa vegetal, tais como: proteínas relacionadas à patogênese (quitinases, glucanases, peroxidases), fitoalexinas e compostos sinalizadores (HEIL; BOSTOCK, 2002). Sua síntese e acúmulo possuem caráter de resposta ativa e sistêmica em caso de resistência induzida (VAN LOON, 1985). Aborda Agnelli (2011), que estas podem se acumular nos espaços intercelulares quando teriam



uma ação direta sobre os patógenos e também nos vacúolos, onde teriam ação após eventos de patogênese que culminam com a descompartimentalização.

Os mecanismos de resistência das plantas são divididos em duas categorias: mecanismos de defesa pré e pós-formados. Ainda são subdivididos em mecanismos que podem ser estruturais, que atuam como barreiras físicas ou bioquímicas, que compreendem a produção de substâncias tóxicas ao patógeno ou então, criando condições desfavoráveis para seu crescimento na planta (MAZARO, 2007).

Segundo Stangarlin et al. (2011), os mecanismos de defesa pré-formados são os que estão na planta antes da mesma entrar em contato com o patógeno, sendo exemplos destes as estruturas: cutícula, tricomas, fibras vasculares e adaptações nos estômatos. Relatam ainda que substâncias químicas como fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases também pertencem à classe dos pré-formados.

Os mecanismos de defesa pós-formados são produzidos ou ativados pela presença do patógeno, estando estes ausentes ou em baixos níveis antes da infecção do patógeno. Exemplos deste tipo de mecanismo é a formação de papilas, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tilose, deposição de goma, compostos bioquímicos como fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese e espécies reativas de oxigênio (PASCHOLATI, 2011).

A combinação de características de defesa estruturais e reações bioquímicas que as plantas utilizam contra os patógenos diferem nas distintas interações patógeno-hospedeiro. Tratando-se ainda, dos mesmos patógenos e planta hospedeira, as combinações variam com a idade, o tipo de órgão e de tecidos atacados e o estado nutricional da planta, assim como das combinações ambientais (AGRAIOS, 2005).

A indução de fitoalexinas está entre os fatores de resistência mais eficientes, pois ocasiona morte repentina de células da planta ao redor dos sítios de infecção (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996). Oliveira et al. (2011) observaram atividade de preparados homeopáticos de *Corymbia citriodora* na indução da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro. Assim como Baldin et al. (2014), verificou indução de fitoalexinas em feijoeiro e sorgo com o uso de extratos etanólicos da própolis, com a maior atividade na concentração de 2,9%. No entanto, Telaxka et al. (2014), não observaram efeito sobre a produção de fitoalexinas em feijoeiro com preparados homeopáticos de *Eucalyptus globulus*.

Em feijoeiro a fitoalexina formada denomina-se faseolina. Alguns produtos naturais já mostraram potencial em induzir a síntese de faseolina em feijoeiro. Toillier (2008) verificou a atividade antibacteriana e indutora de resistência de extratos de *Pycnoporus sanguineus* (cogumelo orelha-de-pau). A conclusão foi que extratos do basidiocarpo do cogumelo controlam a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, tanto por atividade antibacteriana direta, quanto por indução das enzimas de defesa peroxidase e polifenoloxidase, que atuam na formação de fitoalexinas.

Já Vigo-Schultz (2008) constatou que a tintura etanólica de *Lippia Alba* (erva cidreira), piraclostrobina e acibenzolar-S-metil apresentaram os maiores valores nos teores das enzimas polifenoloxidas e peroxidase, o que provavelmente estejam relacionados com a indução de resistência de plantas de feijoeiro a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Brand et al. (2010) avaliaram o efeito de extratos aquosos autoclavados e não autoclavados de alho e alecrim sobre o fungo *C. lindemuthianum* causador da antracnose em feijoeiro, através da produção de faseolina e da severidade em plantas. Concluí-se que o extrato de alho não autoclavado é mais eficiente na redução do crescimento do fungo, enquanto os de alecrim são mais efetivos na indução de faseolina.

Assi (2005) trabalhou com o controle *in vivo* da antracnose em feijoeiro pelo extrato aquoso de basidiocarpo de *P. sanguineus* concluindo que houve redução da severidade em 70% na folha tratada com extrato a 20%, sendo que o fungicida reduziu 73%. Relatou que é possível que o controle tenha ocorrido por atividade antifúngica direta, ou por indução de resistência, visto que no momento da inoculação a atividade da peroxidase apresentava alta pela avaliação.

As rotas de formação e regulação da biossíntese de fitoalexinas, bem como as funções de cada via e suas interações ainda são desconhecidas e incompreendidas, necessitando de novos estudos para determinação dos mecanismos de regulação para desenvolver estratégias de manipulação e melhoria da resistência de plantas contra fitopatógenos (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012). Os mesmos autores ainda citam que o conhecimento do modo de ação das fitoalexinas e os mecanismos utilizados pelos fitopatógenos para desvio desta linha de defesa devem revelar novas possibilidades de controle da produção de fitoalexinas em tecidos e fases específicas do desenvolvimento da planta.

### 2.3.2 Controle alternativo do crestamento bacteriano comum do feijoeiro

Na literatura encontram-se várias pesquisas realizadas envolvendo o controle alternativo da *X. axonopodis* pv. *phaseoli* no feijoeiro, seja por ação direta contra o patógeno ou por indução de mecanismos de defesa na planta.

Dentre as medidas de controle mais efetiva para esta patologia, sendo ambientalmente mais segura e vantajosa do ponto de vista econômico e do aspecto da agricultura sustentável é o desenvolvimento de cultivares mais resistentes (TRINDADE, 2012).

Toillier et al. (2010) verificaram *in vitro* atividade antibacteriana para o filtrado de cultura de *P. sanguineus* nas concentrações acima de 15% e para o extrato de basidiocarpo nas concentrações de 1 a 20%. Relatam ainda que *in vivo* os resultados indicaram o potencial de extratos de basidiocarpo de *P. sanguineus* para o controle de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro, com redução média de 56% na severidade, o que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto por indução de resistência, envolvendo principalmente a ativação das enzimas de defesa vegetal peroxidase e polifenoloxidase.

Vigo et al. (2009) demonstraram que as tinturas de *L. alba* e *L. sidoides* e os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Cinnamomum zeylanicum* apresentaram atividade *in vitro* aos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Sendo que todas as tinturas ensaiadas apresentaram menores valores do progresso da doença (AACPD), em relação à testemunha, merecendo destaque a tintura de *L. alba*, que estavam correlacionadas com os maiores teores de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais, evidenciando uma possível indução de resistência.

Trabalhando com a mancha bacteriana (*X. axonopodis* pv. *vignicola*) em videira, Souza et al. (2012) buscaram verificar a sensibilidade *in vitro* da bactéria ao óleo essencial de *L. microphylla* (chá-de-tabuleiro). Estes concluíram que as concentrações acima de 0,2% inibem quase totalmente o desenvolvimento de colônias bacterianas.

Souza e Shurt (2013), ao trabalharem com a mancha bacteriana do feijão-caupi utilizando o óleo essencial de *L. microphylla* na concentração de 0,2% e nas condições testadas não verificaram nenhum efeito, seja protetor ou curativo.

Dal'Maso et al. (2012) testaram extratos hidroalcoólicos de cúrcuma, alecrim e orelha-de-pau *in vitro* sobre a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Verificaram que os extratos das três espécies vegetais apresentaram potencial de controle da bactéria, desde que não autoclavadas.

Viecelli e Moerschbacher (2013) obtiveram resultados promissores com a aplicação de manganês via foliar no feijoeiro, observando uma redução de até 47% da severidade da doença comparados com os resultados da testemunha.

Trabalhando com a cultura da soja, Mazaro et al. (2008) testaram extratos de *Eugenia uniflora* (pitangueira) na indução da fitoalexinas, chegando a conclusão de que os preparados de pitangueira possuem potencial para induzir a síntese da fitoalexina gliceolina nos cotilédones. Arruda et al. (2012) também trabalharam com a cultura da soja, utilizando extratos aquosos dos cogumelos *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e *P. sanguineus*. Tais autores concluíram que as maiores concentrações dos extratos provocaram maior acúmulo de fitoalexinas nos cotilédones de soja.

Em experimento com preparados homeopáticos, utilizando óleo essencial de *E. globulus* sobre o desenvolvimento bacteriano de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e na indução de fitoalexinas em hipocótilos estiolados de feijão, nas dinamizações de 1, 6, 12, 24 e 30CH em álcool 30% avaliou-se que os mesmos não afetaram a síntese de fitoalexinas mas apresentaram efeito estimulante sobre a bactéria, indicando o envolvimento de outros mecanismos que não o efeito direto sobre o fitopatógeno (TELAXKA et al., 2014).

## 2.4 FUMO BRAVO

O fumo-bravo (*Solanum mauritianum* Scop) é uma arvoreta que comumente atinge dois a quatro metros de altura (SMITH; DOWNS, 1966), podendo, no entanto, alcançar altura superior a 10 m e diâmetro superior a 20 cm. Pertence à família Solanaceae (ZUCHIWSCHI et al., 2010). É nativa no Sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e norte da Argentina, apresentando reprodução parcialmente autogâmica (RAMBUDA; JOHNSON, 2004).

A espécie é tipicamente pioneira, comum às áreas antropizadas (beira de estradas, borda de florestas e roças abandonadas), excepcionalmente abundante na

Floresta Estacional Decidual da Mata Atlântica. Nesta tipologia imprime à paisagem da floresta secundária um aspecto característico e próprio (IBGE, 1990).

Produz frutos praticamente durante todo ano, os quais são consumidos, principalmente, por pássaros, sendo também uma das principais espécies de vegetais da dieta do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (CHEIDA, 2005). A entomofauna que interage com a espécie também é bastante significativa, pois de acordo com Olckersl, Medal e Gandolfo (2002) e Pedrosa-Macedo et al. (2003) constatarem pelo menos 34 espécies de insetos em associação com a planta.

Segundo Scherer e Jarenkow (2006), vários atributos conferem a *S. mauritianum* um alto valor ecológico, sendo que o mesmo possui: polinização entomófila, sementes ortodoxas, formação de banco de sementes no solo, germinação estimulada pelo fogo, rápido crescimento (com menos de um ano pode tornar-se reprodutiva), longevidade de até 15 anos e ampla área de dispersão. Pedrosa-Macedo et al. (2003) relatam que embora fora do seu habitat natural, *S. mauritianum* é considerado daninha e representa um problema ambiental pela agressividade, rusticidade e elasticidade na ocupação em áreas abertas, sendo também considerada planta tóxica e hospedeira de pragas à horticultura.

Alguns autores como JÄGER et al. (1996), Vieira e Carvalho (1993), Lindsey et al. (1999), relatam que há duas décadas esta e outras espécies do gênero *Solanum* estão recebendo especial atenção de pesquisadores em razão de conterem compostos como alcalóides-esteroidais (solasodina) de grande interesse farmacêutico. Relatam ainda que a solasodina é uma substância análoga a diosgenina, droga usada pela indústria farmacêutica para síntese de hormônios, em particular para anticoncepcionais.

Vieira (1989) mediu a concentração de solasodina em frutos verdes de *S. mauritianum* e detectou uma concentração de 2,0% a 3,5% sobre o peso seco, detectando, portando, o alto potencial medicinal da espécie. Tradicionalmente as folhas novas são usadas para baixar a febre e inflamações e a espécie é consumida pelo gado, o que explica a sua não ocorrência em pastagens (SMITH; DOWNS, 1966).

Consideradas as características ecológicas associadas à *S. mauritianum*, supõe-se que devido ao seu rápido dinamismo (polinizadores abundantes e reprodução parcialmente autogâmica, resiliência ambiental, abundante produção de sementes e dispersão zoocórica), a diversidade genética é maior dentro do que

entre populações naturais da espécie. Por outro lado, a fonte de propágulos responsáveis à perpetuação da espécie é limitada a poucos indivíduos isolados que se encontram sob constante pressão de redução populacional em razão das atividades agropecuárias. Tais eventos podem influenciar a estrutura genética das populações remanescentes (RUSCHEL; PEDRO; NODARI, 2008).

Em um estudo de levantamento etnoveterinário Bezerra et al. (2014) relataram que algumas pessoas entrevistadas citaram o fumo-bravo (*S. mauritianum*), como carrapaticida, entretanto não foi encontrado trabalho que falasse do seu possível potencial terapêutico contra carrapatos. Em estudos realizados por Avancini (2002), Carvalho (2004) e Gonçalves (2005), sobre análise de plantas com potencial anti-estafilocócica, *S. mauritianum* não apresentou nem uma atividade. De acordo com Zuchiwschi et al. (2010) esta espécie é usada para tratar amarelão nas criações domesticadas.

Fermentados das plantas erva-de-passarinho (*Struthantus flexicaulis*) e fumo-bravo (*S. mauritianum*) foram testados por Nascimento, Pensera e Sartori (2014), e concluíram seu efeito sobre fungos fitopatogênicos. Observaram uma inibição de 100% do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* do tomateiro na concentração de 20% do fermentado, os quais foram mantidos por 15 dias de fermentação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul – PR, e na casa de vegetação climatizada localizada na área experimental da instituição.

#### 3.1 OBTENÇÃO DO BIOFERMENTADO E EXTRATO AQUOSO DE FUMO-BRAVO

Os biofermentados foram obtidos a partir de folhas frescas de fumo-bravo obtidas de plantas de ocorrência espontânea no município de Laranjeiras do Sul/PR. As folhas (Figura 1) foram pesadas e cortadas em pedaços homogêneos de aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^2$  (Figura 2) na proporção de 100 gramas de folha para cada 1000 ml de água destilada. Em seguida o material foi acondicionado em garrafas pet por 5, 10, 15 e 20 dias no escuro a  $25\text{C } ^\circ\text{C}$ , com e sem a adição de açúcar mascavo a 3%. Após o período de fermentação, o material foi filtrado em gaze, papel de filtro e utilizado.

O extrato aquoso a 20% foi obtido com a trituração em liquidificador por 30 segundos de 100g de folhas frescas de fumo-bravo para 500 mL de água, em seguida foi feita a filtragem com gaze, em papel de filtro e logo após foi utilizado para os bioensaios diluindo-se nas concentrações preestabelecidas.

Figura 1 - Folhas de fumo-bravo utilizadas nos experimentos.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

Figura 2 - Folhas de fumo-bravo picadas e submetidas à fermentação.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

### 3.2 ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DO FITOPATÓGENO

A partir de folhas sintomáticas de feijoeiros coletadas na região de Laranjeiras do Sul, foi isolada a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Figura 3). Esta foi cultivada em placas de Petri (Figura 4), 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 mantidas a 28°C em escuro por 48 horas, momento em que foram usadas para o preparo do inóculo. A suspensão bacteriana foi preparada em solução salina (NaCl 0,85%) com concentração ajustada para  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, com base em curva de absorbância a 580 nm (KUNH, 2006). A manutenção da bactéria por períodos prolongados foi realizada através de inoculação e re-isolamento em plantas de feijoeiro.



Figura 3 - Folha sintomática de feijoeiro utilizada no isolamento da bactéria.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

Figura 4 - Placa de Petri contendo o inóculo da bactéria.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

### 3.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram realizados ensaios de atividade direta dos biofermentados sobre a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Para o experimento, tubos de ensaio estéreis (capacidade 10 mL) foram autoclavados a 120 °C por 20 min. Em seguida, cada tubo de ensaio recebeu concentrações iguais para meio de cultura caldo nutriente e os respectivos tratamentos, sendo biofermentados com ou sem açúcar mascavo de 5, 10, 15 e 20 dias, EA a 1%, 5%, 10%, 15% e 20%. Nos tubos contendo o meio de cultura e os tratamentos foi adicionado 100 µL de suspensão bacteriana com  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. , totalizando o volume final de 5mL por tubo.

Os tubos foram mantidos por 48 horas a 27 °C em escuro e após determinada a absorbância a 580 nm. Água destilada foi utilizada como testemunha.

### 3.4 ENSAIO DE INDUÇÃO DE FITOALEXINA

Foi utilizado para a determinação da fitoalexina faseolina a metodologia de Dixon et al. (1983), com algumas modificações. Sementes de feijão da variedade IPR-Tuiuiu foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos. Após, foram lavadas em água destilada estéril, semeadas em areia esterilizada por autoclavagem (120 °C por uma hora a 1atm) e mantidas no escuro a 24°C durante nove dias.

Após nove dias, segmentos de hipocótilos estiolados com 5cm foram destacados das plântulas, lavados em água estéril e mantidos sobre papel absorvente por 30 minutos. Quatro segmentos de hipocótilo (aproximadamente 1g) foram colocados em cada placa de Petri (Figura 5), contendo papel germitex umedecido com água destilada estéril. Os tratamentos nas concentrações de 1; 5; 10; 15; 20% do extrato aquoso (EA) foram pulverizados sobre os hipocótilos. Este ensaio teve como testemunha água destilada.

Outro ensaio realizado foi utilizando os biofermentados na concentração de 10%. Os tratamentos foram fermentados com 5, 10, 15 e 20 dias sem açúcar mascavo; biofermentados com 5, 10, 15 e 20 dias com açúcar mascavo a 3%; EA a 10% sem açúcar mascavo.

Figura 5 -Placas de Petri contendo os hipocótilos tratados.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

As placas de Petri foram mantidas a 24°C em escuro por 48 h. Depois desse período, os hipocótilos foram transferidos para tubos de ensaio com 10 mL de álcool 70%, mantidos a 4°C por 48 h, e agitados por uma hora para extração da fitoalexina.

O teor de faseolina foi mensurado indiretamente através do espectrofotômetro a 280nm (BAILEY; BURDEN, 1983).

### 3.5 ENSAIO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

Avaliação dos biofermentados de fumo-bravo a severidade do crestamento bacteriano comum sob condições de campo, foi procedida da seguinte forma. Plantas da cultivar IPR - Tuiuiu foram cultivadas em vasos (capacidade de 2 litros) com mistura de solo, areia e composto orgânico na proporção de 2:1:1, respectivamente. Em cada vaso foram semeadas cinco sementes, sendo realizado desbaste 15 dias após a semeadura. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente à temperatura de  $24 \pm 2$  °C e Umidade relativa de aproximadamente 70%.

. Aos 60 dias após a semeadura, os tratamentos foram aplicados via aspersão no primeiro trifólio de cada planta. Constituíram tratamentos fermentados com 15 dias com e sem a adição de açúcar mascavo, EA a 10% com e sem a adição de açúcar mascavo. Três dias após, foi realizada a inoculação com suspensão bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> no primeiro e no segundo trifólio.

A inoculação foi realizada por meio de aspersão com o inóculo, sendo estas mantidas em câmara úmida por 6 horas antes e 24 horas depois da inoculação, com umidade relativa de 100%, conforme Romeiro (2001). Após, as plantas permaneceram em casa de vegetação, sendo irrigadas diariamente.

Para a determinação da severidade do crestamento bacteriano comum no feijoeiro (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) foi utilizada a escala diagramática adaptada por Azevedo (1997), sendo o resultado expresso em porcentagem de área lesionada de folhas. As imagens das plantas foram tiradas 10 dias após a inoculação do patógeno. O ensaio em plantas teve como testemunha água destilada.

Foi avaliada também a interação entre os fatores tratamentos e trifólios do feijoeiro. Fez-se a análise em blocos casualizados em esquema fatorial utilizando para tanto, o programa estatístico ASSISTAT versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

### 3.6 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

Plantas da cultivar IPR - Tuiuiu foram cultivadas em vasos (capacidade de 2 litros) com mistura de solo areia na proporção de 2:1, respectivamente. Em cada vaso foram semeadas cinco sementes, sendo realizado desbaste 15 dias após a semeadura. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente.

Os tratamentos para avaliação da indução de resistência e síntese de enzimas de defesa foram aplicados quando as plantas atingiram o estágio V3/V4, com 30 dias após a semeadura. Os tratamentos utilizados foram biofermentados com 5, 15, 15 e 20 dias de fermentação sem ou com adição de açúcar mascavo, extrato aquoso (EA) a 1, 5, 10 e 15% e água destilada. Os tratamentos foram pulverizados nas plantas, até o ponto de escorrimento.

Três dias após a aplicação dos tratamentos foram coletados discos foliares com 1,5cm de diâmetro, sendo 5 discos do trifólio tratado e cinco discos do trifólio não tratado de cada parcela. Os discos foliares foram acondicionados em papel alumínio e imediatamente transferidos para caixa de isopor contendo gelo, e em seguida transferidos para freezer e mantidos a -20 °C até a realização das análises bioquímicas.

As amostras de tecido foliar foram maceradas em 4mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) contendo 1% (p/p) de PVP (Polivinil-Pirrolidona), em almofariz de porcelana (Figura 6). Os homogeneizados foram centrifugados a 14.000g durante 20 min. a 4°C. O sobrenadante obtido, considerado como extrato enzimático, foi utilizado para a determinação do conteúdo de proteínas e atividade enzimática. Todo o material empregado foi mantido sob refrigeração.

Figura 6 – Amostra de tecido foliar macerada em almofariz de porcelana.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976). Para isso, foram homogeneizados 600  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e 200  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e 125 mL de água destilada). A determinação do conteúdo de proteínas foi realizada através da leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. Cada amostra foi formada por três réplicas. A cubeta de referência foi constituída de 800  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200  $\mu\text{L}$  do reagente. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína. Os resultados foram expressos em  $\text{mg proteína}^{-1}\text{mL amostra}^{-1}$ .

A atividade das polifenoloxidasas foi determinada conforme a metodologia proposta por Duangmal e Apenten (1999). Para tanto, o substrato para enzima foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A reação foi conduzida misturando-se 900  $\mu\text{L}$  do substrato e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático seguida de leituras em espectrofotômetro, a 420 nm. As leituras foram realizadas de forma direta por um período de 2 min. Os resultados foram expressos em variação  $\text{min}^{-1}\text{mg}$ .

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foram acrescidos de 400  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500  $\mu\text{L}$  de solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Incubou-se essa mistura a 40°C durante 2 h. Ao final desse período adicionaram-se 60  $\mu\text{L}$  de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se a

leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (100 µL de extrato enzimático e 900 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido trans-cinâmico e expressa em mg de ácido trans-cinâmico h<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

### 3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

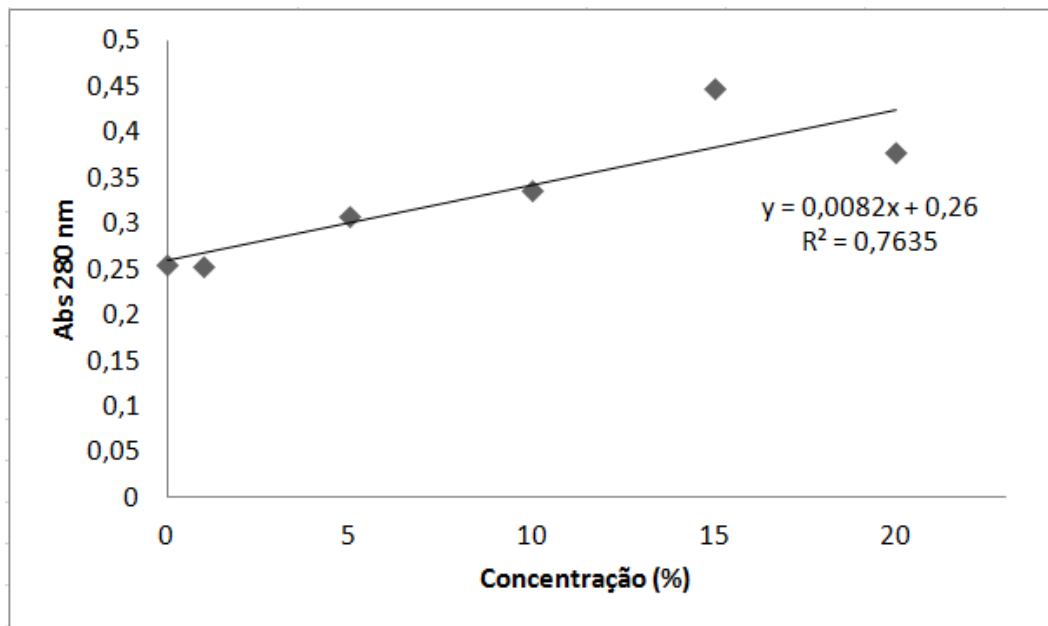
Os resultados foram submetidos à teste de média em esquema fatorial pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com auxílio do sistema computacional ASSISTAT versão 7.7. (SILVA; AZEVEDO, 2002).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 INDUÇÃO DE FASEOLINA EM FEIJOEIRO

Observa-se que o extrato aquoso (EA) de fumo-bravo, teve efeito sobre a indução de síntese da fitoalexina faseolina em feijoeiro, conforme demonstrado pela Figura 7. Nota-se que com o aumento da concentração do extrato aquoso o teor de faseolina também foi incrementado. Esse resultado mostra o potencial em induzir fitoalexina pelo extrato de fumo-bravo.

Figura 7 - Teor de faseolina em feijoeiro com uso de extrato aquoso (EA) de fumo-bravo em diferentes concentrações.



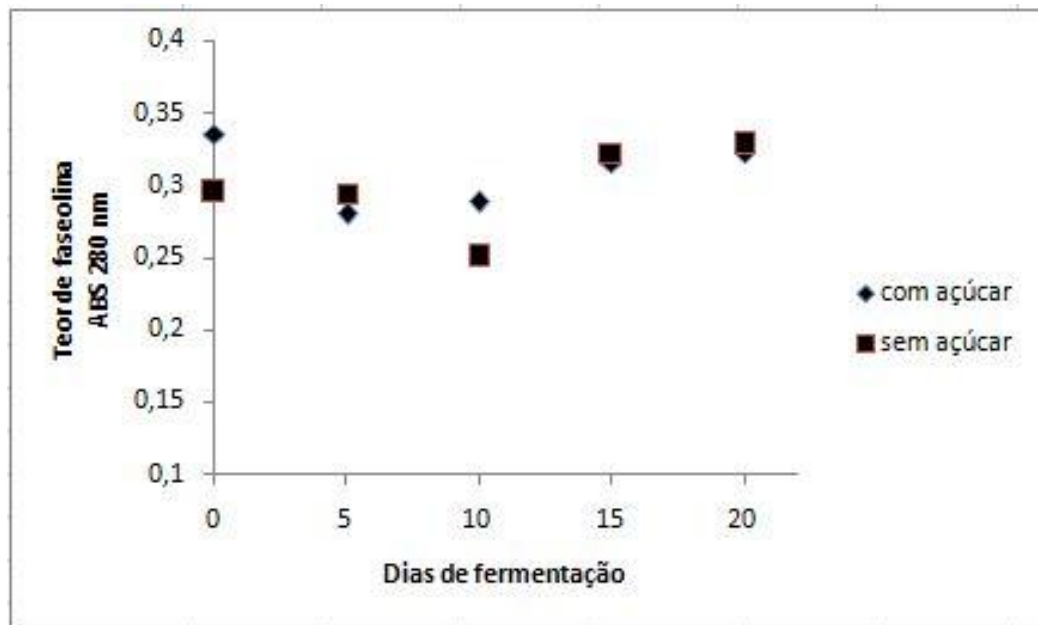
Fonte: Fábio Junior Telaxka

Não foram encontrados trabalhos na literatura com a utilização de EA de fumo-bravo sobre a indução de faseolina em feijoeiro. No entanto, há trabalhos com a utilização de extratos de outras plantas, ou mesmo com outros tipos de indutores, os quais demonstram resultados positivos sobre a indução de faseolina no feijoeiro. Brand et al. (2010) avaliaram o efeito de extratos aquosos autoclavados e não autoclavados de alecrim sobre a produção de faseolina no feijoeiro, e notaram que os extratos não autoclavados são mais efetivos na sua indução. Também foi

relatada a atividade de preparados homeopáticos de *C. citriodora* na indução da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro (OLIVEIRA et al., 2011).

Avaliou-se que não houve diferença entre os tempos de fermentação nem entre a presença e ausência de açúcar mascavo nos biofermentados de fumo-bravo a 10% sobre a produção da fitoalexina faseolina do feijoeiro (Figura 8).

Figura 8 - Teor de faseolina em feijoeiro por biofermentados de fumo-bravo com e sem a adição de açúcar mascavo em diferentes tempos de fermentação.



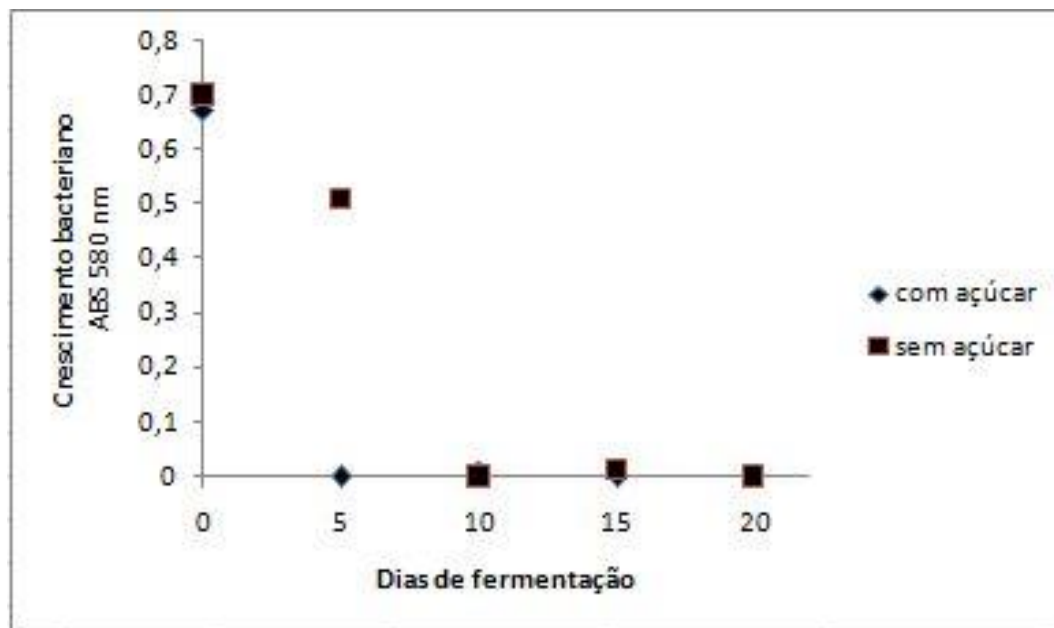
Fonte: Fábio Junior Telaxka

#### 4.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SOBRE *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

Os biofermentados de fumo-bravo demonstraram ter efeito antimicrobiano direto sobre a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Observa-se que com o avanço do tempo de fermentação, ocorreu maior efeito inibitório sobre a bactéria (Figura 9).



Figura 9 - Efeito antibacteriano dos biofermentados de fumo-bravo com e sem a adição de açúcar mascavo sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

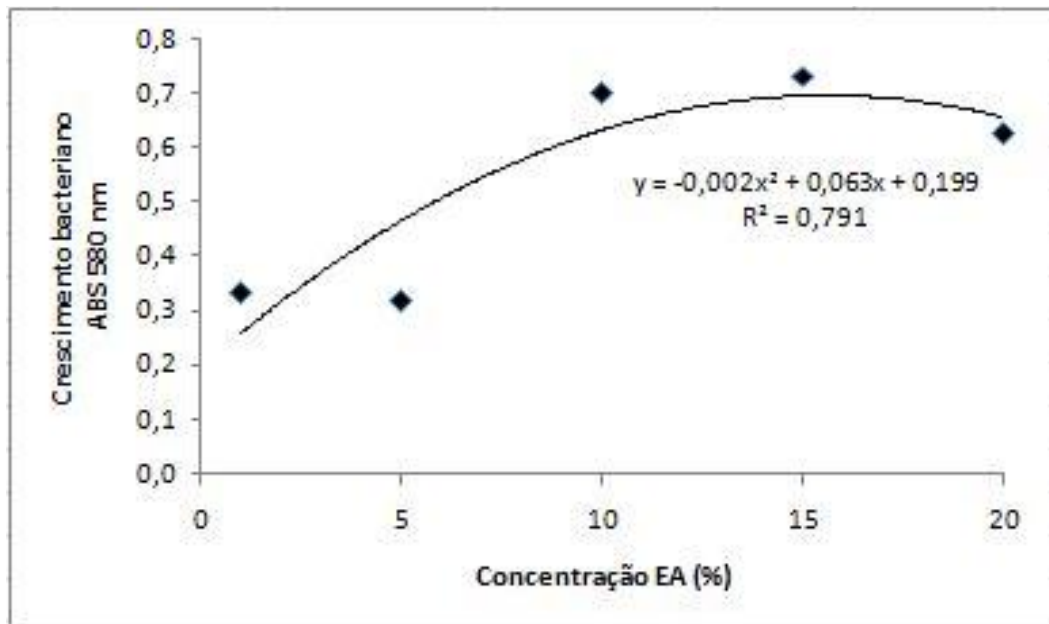
Para os testes de efeito direto sobre a *X. axonopodis* pv. *phaseoli* com o uso dos biofermentados de fumo-bravo com açúcar mascavo a 3%, este demonstrou efeito inibitório total da bactéria a partir do quinto dia de fermentação, demonstrando que o açúcar potencializa o efeito do fermentado sobre a bactéria como pode ser observado na Figura 9. Já o biofermentado sem açúcar inibiu totalmente o crescimento bacteriano a partir de 10 dias de fermentação.

Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Nascimento, Pensera e Sartori (2014), onde observaram inibição de 100% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* avaliado ao 14º dia, com a utilização de fermentados das plantas erva-de-passarinho (*S. flexicaulis*) e fumo-bravo (*S. mauritanum*), sendo utilizadas na concentração de 20% e, submetidos à fermentação por 15 dias.

No entanto, Nascimento, Pensera e Sartori (2014), relatam que tanto a concentração do fermentado de fumo-bravo quanto o tempo de fermentação, não tiveram efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* do tomateiro, avaliado ao 14 dia após aplicação dos tratamentos. Na testemunha obteve-se uma absorbância média de 0,702 nm, enquanto que, a partir do décimo dia de fermentação os dados observados se manterão próximos a zero, demonstrando quase total inibição do crescimento da *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

O EA nas concentrações de 1%; 5%; 10%; 15% e 20% sem adição de açúcar mascavo não demonstraram ter efeito sobre a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, e sim estimularam o crescimento da bactéria (Figura 10). Esse efeito estimulante deve-se possivelmente a nutrientes presentes no extrato e a ausência ou baixa concentração de compostos antibacterianos. A equação quadrática indica que o estímulo no crescimento foi maior na concentração de 15%, e a partir daí tende a reduzir esse efeito.

Figura 10. Efeito antibacteriano de extrato aquoso (EA) de fumo-bravo em diferentes concentrações sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

Não foram encontrados na literatura trabalhos realizados com EA de fumo-bravo, mas outros autores utilizando extratos de plantas observaram efeito positivo sobre patógenos, como foi verificado por Piva (2013), que o extrato de canola macerado na concentração de 12% foi eficiente na redução de mais de 50% de incidência e mais de 90% da severidade da doença do oídio no pepineiro.

Ferreira (2013) testou extratos de folhas de erva cidreira e de sementes de graviola e observou efeito inibitório do crescimento micelial do patógeno *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose do mamoeiro.

#### 4.3 EFEITO PROTETOR EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

Conforme a Tabela 1 houve diferença na severidade do crestamento bacteriano entre os tratamentos somente em trifólios tratados. Na testemunha água a área necrosada da folha teve a maior média de severidade, com 10,6% do limbo foliar danificado.

Os tratamentos que propiciaram menor severidade da doença foram o extrato aquoso a 10% e o biofermentado de fumo-bravo com 15 dias de fermentação, ambos com açúcar mascavo a 3%. A média de severidade no primeiro trifólio foi de 1 e 3 %, respectivamente. Os resultados demonstram possíveis efeitos dos tratamentos sobre a indução de mecanismos de defesa da planta, com a ativação de enzimas relacionadas a proteção vegetal à agentes fitopatogênicos, mostrando-se serem eficientes no controle da bactéria *in vivo*.

Estes valores demonstram que o açúcar aumentou o efeito antibacteriano.

Tabela 1. Médias da severidade do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*).

Tratamentos	Médias (%)	
	1ª trifólio	2ª trifólio
H2O	10,6aA	1,8aB
EA 10% sem açúcar	2,6bcA	1aA
Fermentado sem açúcar por 15 dias	6,6abA	2aB
EA 10% com açúcar	1cA	0,4aA
Fermentado com açúcar 15 dias	3bcA	1,2aA

As médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que para a 1ª folha trifoliada do feijoeiro a severidade do crestamento bacteriano comum foi maior para os tratamentos água e biofermentado de fumo-bravo por 15 dias sem adição açúcar mascavo, enquanto que os tratamentos EA a 10% com e sem a adição de açúcar mascavo e o biofermentado

de 15 dias com açúcar não se diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Não houve diferença entre os tratamentos para a 2ª folha trifoliada.

Quanto aos trifólios, para os tratamentos EA a 10% com e sem a adição de açúcar mascavo e o biofermentado de 15 dias com açúcar mascavo não ocorreu diferença estatística da severidade do cretamento bacteriano comum entre o primeiro e o segundo trifólio do feijoeiro.

Não foram encontrados trabalhos com a utilização de fumo-bravo e quantificação da severidade do cretamento bacteriano comum do feijoeiro, no entanto, já há estudos com outros produtos e substâncias com este propósito. Redução da severidade da doença em até 47% foi encontrada por Viecelli e Moerschbacher (2013) quando aplicado manganês via foliar no feijoeiro no estágio V2 e comparando com as testemunhas água, bactericida Agrimicina (50 mg i.a.L-1) e acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L-1).

Toillier et al. (2010) obtiveram *in vivo* resultados que indicaram o potencial de extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus* para o controle de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro, com redução média de 56% na severidade, o que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto por indução de resistência, envolvendo principalmente a ativação das enzimas de defesa vegetal peroxidase e polifenoloxidase.

Baldo (2008) avaliou em plantas de feijoeiro filtrados de cultura (EAF) de *P. sanguineus* a 5 e 10%, observando que os mesmos reduziram 69 e 67%, respectivamente, a severidade da *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas 1ªs folhas, enquanto o fungicida azoxystrobin (4 g i. a. L<sup>-1</sup>) e Acibenzolar- S- Metil (75 mg i. a. L<sup>-1</sup>) reduziram em 87 e 76%, respectivamente. Nas 2ªs folhas as maiores reduções foram observadas para extrato aquoso de Basidiocarpo (EAB) a 10% e EAF 5 e 10%, com redução média da severidade de 63%. Esta redução na severidade pode estar associada com as enzimas peroxidase (POX), fenilalanina amônia-liase (FAL) e β-1,3 glucanase que apresentaram alterações na atividade específica, o que não foi observado para a polifenoloxidase (PFO).

Díaz et al. (2000) relataram que a severidade da doença, avaliada com auxílio de escala diagramática, não apresentou relação linear significativa ( $P > 0,01$ ) com a produção. No entanto, observaram que a duração da área foliar sadia (HAD) relacionou-se linearmente de forma significativa ( $P \leq 0,01$ ) com a produção nos dois

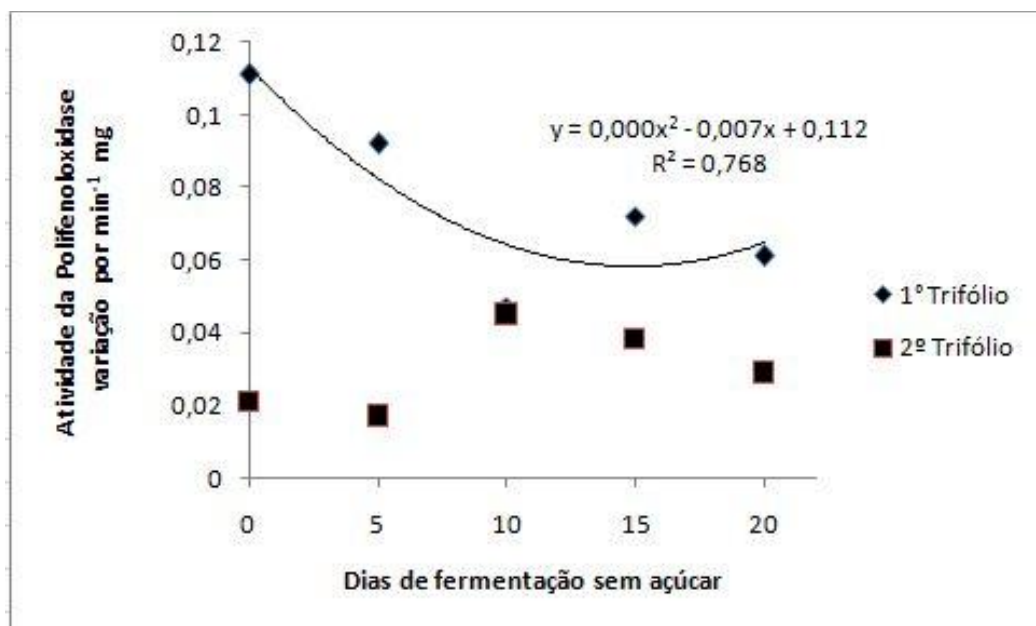
experimentos, com a utilização de duas cultivares, sendo estas a cultivar IAC-Carioca e a cultivar Rosinha.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA

##### 4.4.1 Atividade da Polifenoloxidase (PFO)

O fermentado de fumo-bravo sem açúcar não proporcionou aumento da atividade da enzima polifenoloxidase (Figura 11). O tratamento interferiu negativamente a atividade da enzima no primeiro trifólio do feijoeiro, sendo demonstrado pela equação quadrática polinomial. No segundo trifólio não houve diferença entre os dias de fermentação do preparado.

Figura 11- Atividade da polifenoloxidase com a utilização de fermentados de fumo-bravo sem adição de açúcar mascavo após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

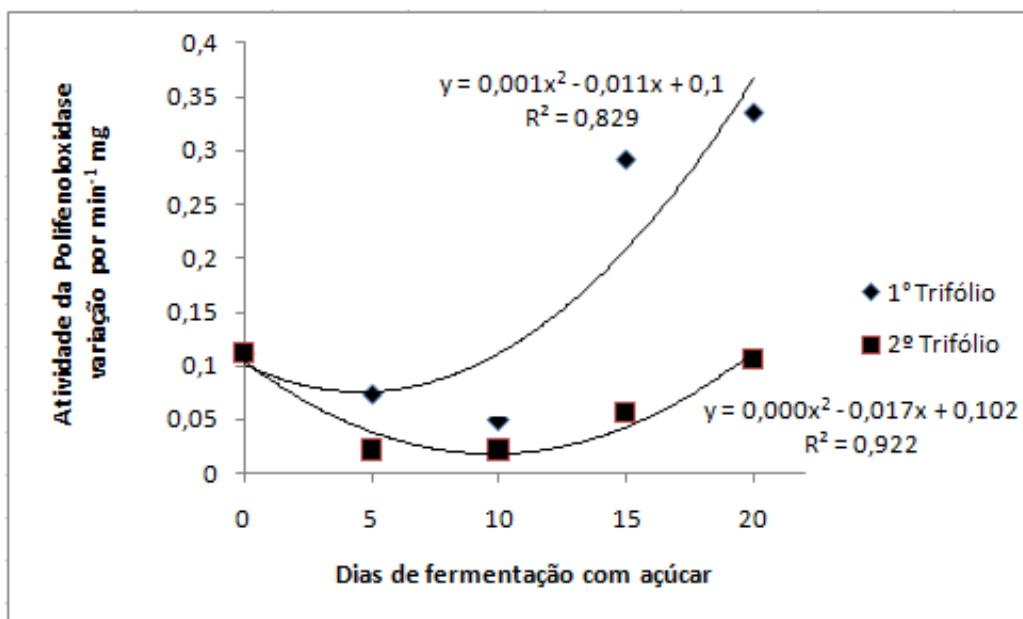
Portanto, o fermentado sem açúcar mascavo a 3% não promoveu indução de polifenoloxidase em feijoeiro. Embora não foram encontrados estudos com fumo-bravo, alguns trabalhos envolvendo análises de atividade enzimática relacionadas à defesa vegetal contra fitopatógenos, como de Garcia (2014) onde a mesma observou que a suspensão miceliada aquosa (SAM) de *A. brasiliensis* em diferentes

concentrações, acibenzolar-S-metil (ASM) e como tratamento testemunha água destilada não interferiram na atividade da polifenoloxidase (PFO).

Plantas de rúcula apresentaram incremento na atividade específica de polifenoloxidase em relação ao tratamento água quando tratadas com indutores bióticos e inoculadas com *Albugo candida* (YURKIV et al., 2007). Eckstein et al. (2007) observaram que houve indução da atividade específica da polifenoloxidase em rúcula para o mesmo patossistema quando tratadas com indutores abióticos.

O efeito do biofermentado de fumo-bravo com açúcar foi positivo como indutor da atividade da polifenoloxidase, onde se observa incremento na atividade com o passar do tempo de fermentação no trifólio tratado (Figura 12). Com 20 dias de fermentação foi quando se obteve maior a atividade da polifenoloxidase. No segundo trifólio (não tratado), não houve incremento na atividade da enzima, mas sensível inibição em períodos intermediários de fermentação.

Figura 12 - Atividade da polifenoloxidase com a utilização de fermentados de fumo-bravo com adição açúcar após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.

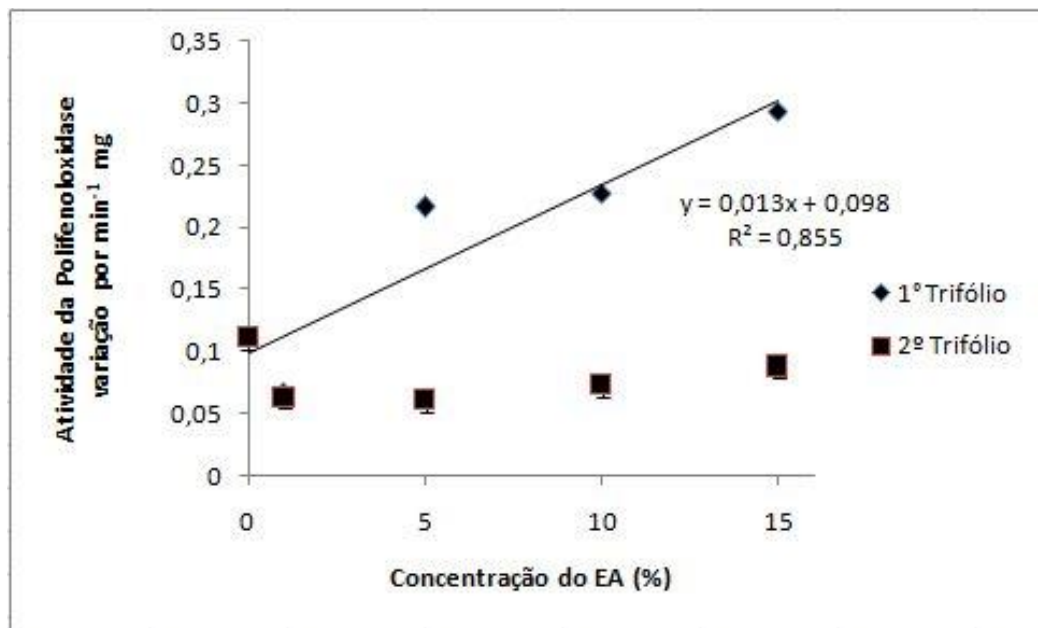


Fonte: Fábio Junior Telaxka

Com a aplicação do extrato aquoso sobre as folhas do feijoeiro e análise após 72 horas, nota-se que o mesmo teve efeito indutor na atividade da polifenoloxidase no primeiro trifólio, onde os resultados são explicados pela equação linear. No segundo trifólio (não submetido aos tratamentos), não houve incremento na atividade da

enzima. Isso demonstra que, tanto os biofermentados quanto o extrato aquoso (EA) de fumo-bravo possuem efeito local para indução dessa enzima (Figura 13).

Figura 13 - Atividade da polifenoloxidase com a utilização de extrato aquoso (EA) de fumo-bravo após 72 horas na 1ª (tratada) e 2ª (não tratada) folha trifoliada.

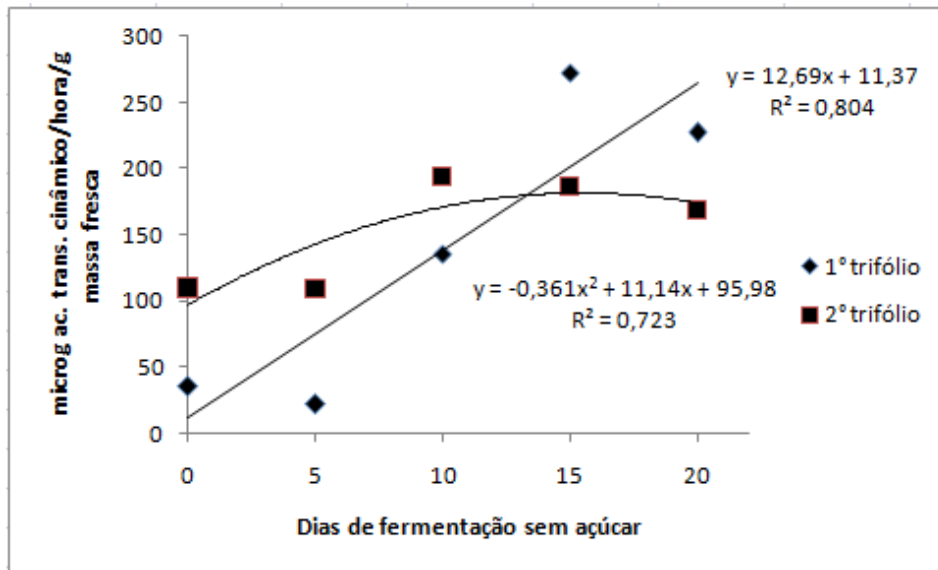


Fonte: Fábio Junior Telaxka

#### 4.4.2 Atividade da Fenilalanina amônia-liase (FAL)

Os biofermentados de fumo-bravo sem a adição de açúcar mascavo promoveram efeito indutor sobre a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase de forma mais significativa no primeiro trifólio, sendo que os resultados são explicados pela equação linear (Figura 14), indicando aumento na atividade com aumento nos dias de fermentação. Observa-se também incremento da atividade enzimática para o segundo trifólio com maior atividade enzimática para o biofermentado de 10 dias.

Figura 14 - Atividade da fenilalanina amônia-liase com a utilização de fermentados de fumo-bravo sem açúcar após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.

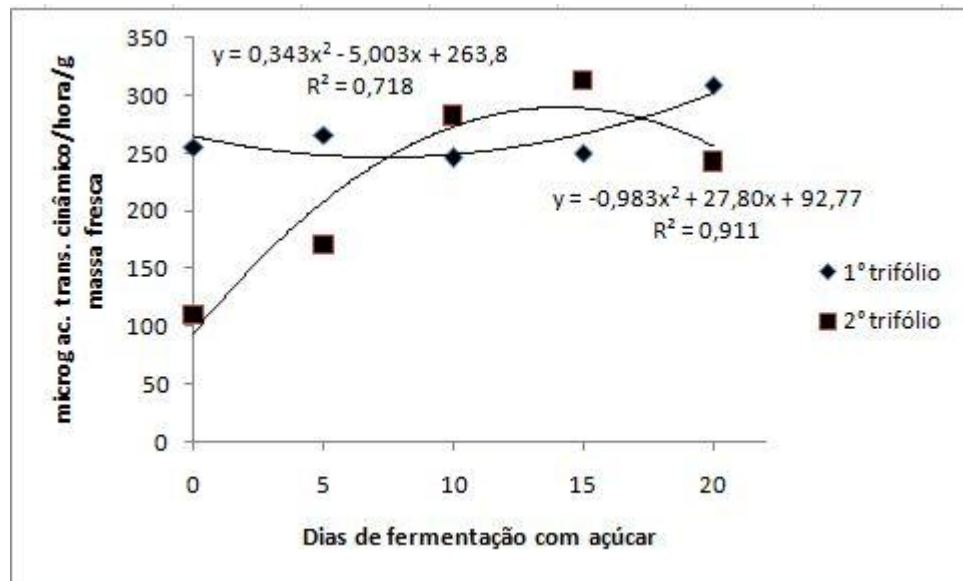


Fonte: Fábio Junior Telaxka

Com a adição de açúcar mascavo no biofermentado ocorreu aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase tanto para o primeiro quanto para o segundo trifólio (Figura 15). Para o segundo trifólio os biofermetados mais eficientes na indução da atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase foram os de 10 e 15 dias de fermentação, demonstrando resultado semelhante ao biofermentado sem a adição de açúcar mascavo.



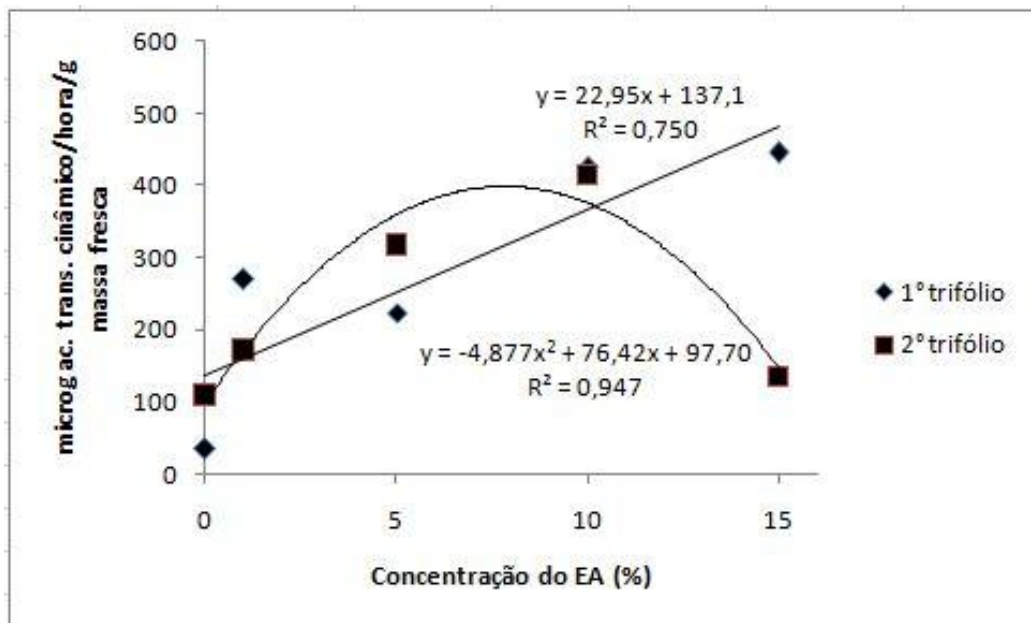
Figura 15 - Atividade da fenilalanina amônia-liase com a utilização de fermentados de fumo-bravo com adição de açúcar mascavo após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

O extrato aquoso também demonstrou ter efeito sobre a atividade da enzima, sendo que no primeiro trifólio a atividade foi linear, ou seja, aumentou com o aumento da concentração do extrato. No segundo trifólio as concentrações que induziram a atividade da enzima foram as de 5 e 10%, sendo que a partir desta concentração houve uma diminuição da atividade da enzima (Figura 16). Esses resultados reforçam o efeito indutor de fenilalanina amônia-liase pelo extrato de fumo-bravo, tanto de forma local e também sistêmica, pela atividade também sobre folhas não tratadas. Esse aspecto torna-se muito importante uma vez que essa enzima está relacionada as mais importantes rotas de mecanismos de defesa das plantas.

Figura 16 - Atividade da fenilalanina amônia-liase com a utilização de extrato aquoso (EA) de fumo-bravo após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.



Fonte: Fábio Junior Telaxka

Na literatura não foram encontrados trabalhos que utilizaram extratos aquosos ou biofermentados de fumo-bravo na indução da atividade enzimática. Porém em meio ao fenômeno da indução de resistência, a FAL é uma das enzimas mais estudadas (KUHN, 2007). Ao trabalhar com arroz induzido com *Pseudomonas fluorescens* contra *X. oryzae* pv. *oryza*, Vidhysekaram et al. (2001) observaram redução na severidade da mancha bacteriana em 85% associado ao aumento da atividade da FAL.

Com Ácido Salicílico (AS), Gálias et al. (2004) induziram resistência em feijoeiro e observaram redução da multiplicação do vírus do mosaico branco do trevo (WCIMV), bem como aumento na expressão da FAL. No entanto, há trabalhos que relatam não terem observado alterações na atividade da FAL, como Silva et al. (2004) induzindo resistência em tomateiro com *Bacillus cereus* através do tratamento de sementes. Porém observaram que a atividade da enzima peroxidase tinha sido elevada em dez vezes.

## 5 CONCLUSÃO

O extrato aquoso de fumo-bravo induziu a síntese de faseolina em hipocótilos de feijoeiro, conforme aumento na concentração do extrato. Já os biofermentados não induziram faseolina independentemente da forma e tempo de preparo.

Os biofermentados apresentaram efeito antibacteriano sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Já o extrato aquoso estimulou a multiplicação bacteriana.

Os biofermentados com adição de açúcar mascavo e o extrato aquoso reduziram a severidade do crestamento bacteriano em folhas de feijoeiro tratadas.

O extrato aquoso e os biofermentados de 15 e 20 dias com açúcar mascavo induziram a enzima polifenoloxidase de forma local. Esses derivados de fumo-bravo também induziram a enzima fenilalanina amônia-liase de forma sistêmica, demonstrando o potencial em ativar o metabolismo secundário e defesas de plantas de feijoeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, Â. F. B. Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na região sul de Minas Gerais. **Embrapa Arroz e Feijão**. Dezembro, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafrasulMG/doencas.htm#mbe>> Acesso em 08/ abr./ 2015.
- ABREU, G. F.; TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.78-82, 2008.
- AGNELLI, A. R. **Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas**. 2011, 56 p. Dissertação. Aracaju.
- AGRAIOS, G. N. **Plant pathology**. 5ª ed. New York: Academic, 2005, 922 p.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 73-90, Feb. 2012.
- ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijão (*Phaseolis vulgaris*) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus***. Unioeste, 2005, 51p. Dissertação. Pós-graduação em Agronomia, Marechal Cândido Rondon, 2005.
- ARRUDA, R. S. et al. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 2, 2012.
- AVANCINI, C. A. M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. – Hypericaceae (Guttiferae) – (“escadinha”, “sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico**. 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre.
- AZEVEDO, L. A. S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo.1997.
- BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus***. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008, 85p. Dissertação. Pós – Graduação em Agronomia, Marechal Cândido Rondon, 2008.
- BAILEY, J. A.; BURDEN, R.S. Biochemical changes and phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* following cellular browning caused by tobacco necrosis virus. **Physiological Plant Pathology**, v.3, n.1, p.171-177, 1983.
- BALDIN, D. et al. **Atividade antifúngica e indução de resistência em sorgo e feijoeiro pelo extrato etanólico de própolis**. Vol. IV (2014) – Anais do IV SEPE e IV jornada de iniciação científica. Disponível em <<https://periodicos.uffs.edu.br/index.php/SEPE-UFFS/article/viewFile/1393/1356>> Acesso em 07/ maio/ 2014.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúma: Embrapa –CNPDA, 1991. 388 p.
- BETTIOL, W. **Controle alternativo**. Embrapa Meio Ambiente. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_23\\_299200692526.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_23_299200692526.html) > Acesso em 6/ maio / 2015.
- BEZERRA, L. R. et al. **Plantas utilizadas no combate à ectoparasitoses pelos criadores do município de Bom Jesus, Sul do Piauí**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória ES, 2014.
- BIANCHINI, A. et al. Doenças do feijoeiro. In KIMATI et al., **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4ª ed. São Paulo: Ceres, 2005. P. 333-351.

BONALDO, S. M. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, p. 11-28, 2005.

BRAND, S.C. et al. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p.1881-1887, set. 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CARVALHO, H. H. C. **Avaliação da atividade antibacteriana de plantas com indicativo etnográfico condimentar**. 2004. 200p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 1 - Safra 2013/14, n. 3 - Terceiro Levantamento, Brasília, p. 1-72, dez. 2013.

CHEIDA, C.C. **Dieta e dispersão de sementes pelo lobo guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger 1815) em uma área de campo natural, Floresta Ombrófila Mista e Silvicultura, Paraná, Brasil**. 2005. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DAL'MASO, E.G. et al. Eficiência de extratos hidroalcoólicos na inibição de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, v. 45. 2012, Manaus. **Anais...** Manaus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. Disponível em: <<http://webftp.cpa.embrapa.br/site/Trabalhos/82.pdf>>. Acesso em: 11/out./2015.

DIAZ, C. G. **Avaliação de danos causados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)** 2000. 79p. (Tese de Doutorado) - Piracicaba. Universidade de São Paulo, ESALQ, 2000.

DÍAZ, C. G. et al. Quantificação do efeito do crestamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira** v.26, p.71-76. 2001.

DIXON, R. A. et al. Phytoalexin induction in french bean: intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 71, n. 2, p. 251-256, 1983.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 351-359, 1999.

ECKSTEIN, B. et al. Indução de resistência pela utilização de produtos abióticos no controle de ferrugem branca em rúcula. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p. 238, 2007.

EMBRAPA. **Catálogo de cultivares de feijão comum**. Embrapa Arroz e Feijão, 2013. Disponível em: <[www.cnpaf.embrapa.br/transferecia/tecnologias/cultivares/catalogoFeijao-12jun2013.pdf](http://www.cnpaf.embrapa.br/transferecia/tecnologias/cultivares/catalogoFeijao-12jun2013.pdf)> Acesso em 05/dez./ 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (Brasil). Embrapa Arroz e Feijão. **Cultivo do feijão irrigado na região Noroeste de Minas Gerais**. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/>>. Acesso em: 06/ out./ 2015.

EPAGRI. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. 2ª.ed. Florianópolis: Epagri, 2012. 157p.

FERREIRA, E. F. **Uso de extratos vegetais no controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* penz) em mamoeiro (*Carica papaya* l.)**. Universidade Estadual do Sudoeste da

Bahia, 2013, 53 p. Dissertação. Pós-Graduação em Agronomia, Vitória da Conquista, 2013.

GÁLIAS, I. et al. Salicylic acid-, but not cytokinin– induced, resistance to WCIMV is associated with increased expression of ASM – dependente resistance genes in *Phaseolus vulgares*. **Jornal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, p. 459-466, 2004.

GARCIA, C. **Óleo vegetal no controle do míldio e suspensão miceliada aquosa de *Agaricus brasiliensis* na indução de resistência de videiras cv. Isabel Precoce**. Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2014, 93p. Dissertação. Pós- Graduação em Agronomia, Guarapuava, 2014.

GONÇALVES, A. R. **Fitodesinfecção aplicada à água na perspectiva da agricultura e da agroindústria familiar**. 2005. 130p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GOODWIN, P. H. **Effects of common bacterial blight on leaf photosynthesis of bean**. Canadian Journal of Plant Pathology 14:203-206. 1992.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p.78.

HAMMRSCHMIDT, R. Introduction: definitions and some history. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackweel, 2007, chap.1, p.1-9.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annal sof Botany**, v.89, p.503-512, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Geografia do Brasil: Região Sul**. Rio de Janeiro: IBGE, 1990, v.2, p.419.

IURKIV, L. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase em rúcula tratada com indutores de resistência bióticos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.32, p. 238, 2007.

JÄGER, A. K.; HUTCHINGS, A.; VAN STADEN, J. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin- synthesis inhibitors. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.52, p.95-100, 1996.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas, v. 2. São Paulo: Editora Ceres, 2005. 275p.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vungares*) por acibenzolar - S - metil e *Bacillus cereus*: Aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. USP, 2007, 138 p. Tese. Pós-Graduação em Fitopatologia. Piracicaba, 2007.

KUHN, O. J. et. al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 13-20, jan./mar. 2006.

LOLLATO, M. A.; SEPULCRI, O.; DEMARCHI, M. **Cadeia produtiva do feijão: Diagnósticos e demandas atuais**. Londrina - PR, IAPAR, 2001. 48p.

LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhyzosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, Sept. 1998.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v.25, p.244-249, 1999.

MAHUKU, G. S. et al. Genotypic Characterization of the Common Bean Bacterial Blight Pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by

rep-PCR and PCR–RFLP of the Ribosomal Genes. **Journal of Phytopathology**, Berlin, 154, p. 35–44, 2006.

MANANDHAR, H. K. et al. Suppression of rice blast by preinoculation with avirulent *Pyricularia oryzae* and the non rice pathogen *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v.88, p.735-739, 1998.

MAPA. **Perfil do feijão no Brasil**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em: 05/agos./ 2015.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência a doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007, 105 p. Tese (Doutorado na área de Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MAZARO, S. M. et al. Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea*, *in vitro*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.2, p.208-216, 2013.

MAZARO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciencia Rural**, v.38; n.7; out. 2008.

NASCIMENTO, M.; PENSARA, M. R.; SARTORI, V. C. **Avaliação antifúngica dos fitopatógenos do tomateiro *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *Sclerotinia sclerotiorum* com fermentados das plantas *Solanum mauritianum*, *Chrysanthemum aenerhifolium* e *Struthanthus flexicaules***. XXII Encontro de Jovens pesquisadores: IV Mostra acadêmica de inovação e tecnologia, UCS, 2014. Disponível em: <[http://www.jovenspesquisadores.com.br/2014/restrito/uploads/posters/2014/Michele\\_do\\_Nascimento\\_1407177242.pdf](http://www.jovenspesquisadores.com.br/2014/restrito/uploads/posters/2014/Michele_do_Nascimento_1407177242.pdf)> Acessado em 30/ out./ 2015.

OLCKERS, T.; MEDAL, J. C.; GANDOLFO, D. E. Insect herbivores associated with species of *Solanum* (Solanaceae) In Northeastern Argentina and Southeastern Paraguay, with reference to biological control of weeds in South Africa and the United States of America. **Florida Entomologist**, Lutz, v.85, p.254-260, 2002.

OLIVEIRA, J. S. B. et al. **Indução de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro por preparados homeopáticos de *Eucalyptus citriodora***. Cadernos de Agroecologia, v.6, n.2, p.1-5, 2011.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos . In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia I - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 593-633. 2011.

PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 343-364, 1995.

PEDROSA-MACEDO, J. H. et al. Phytophagous arthropods associated with *Solanum mauritianum* Scopoli (Solanaceae) in the First Plateau of Paraná, Brazil: A cooperative project on biological control of weeds between Brazil and South Africa. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v.32, p.519-522, 2003.

PIVA, C. A. G. **Extratos de canola e própolis no controle de oídio em pepineiro**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013, 91 p. Dissertação. Pós-Graduação em Agronomia, Pato Branco, 2013.

RAMBUDA T. D.; JOHNSON S. D. Breeding systems of invasive alien plants in South Africa: does Baker's rule apply? **Diversity and Distributions**, Matieland, v.10, p.409–416, 2004.

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

RUSCHEL, A. R. PEDRO, J. NODARI, R. O. Diversidade genética em populações antropizadas do fumo bravo (*Solanum mauritianum*) em Santa Catarina, Brasil. **Sci. For., Piracicaba**, v.36, n.77, p. 63-72, mar. 2008.

- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p.71-78, 2002.
- SILVA, H. S. A. et al. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 288-296, 2004.
- SILVA, R. F., PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, n.32, p.189-196, 2007.
- SOUZA, G. R.; SHURT, D. A. **Controle alternativo da mancha bacteriana do feijão-caupi com óleo essencial de *Lippia microphylla***. III CONAC – Congresso Nacional de Feijão-caupi, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/973950/1/CONTROLEALTERNATIVODAMA NCHABACTERIANADOFEIJAOCAUPI.pdf>> Acessado 06/ out./ 2015.
- SCHERER, C.; JARENKOW, J. A. Banco de sementes de espécies arbóreas em floresta estacional no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.29, p.67 77, 2006.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Solanáceas: flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966. 321p.
- STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p 18-46, 2011.
- STADNIK, M. **Indução de resistência a oídios**. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, Campinas. Anais do Congresso Paulista de Fitopatologia, v. 23, p.176-181. 2000.
- TELAXKA, F. J. et al. **Atividade antibacteriana e indução de fitoalexinas em feijão por preparados homeopáticos do óleo essencial de *Eucalyptus globulus***. I Congresso Paranaense de Agroecologia – Pinhais/PR, 2014. Disponível em:< <http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/viewFile/15555/10076>> Acessado em 06/ out./ 2015.
- TOILLER, S. L. **Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus***. Unioeste, 2008, 58p. Dissertação. Pós-graduação em Agronomia. Marechal Cândido Rondon, 2008.
- TOILLIER, S. L. et al. Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.1, p.99-110, jan./mar. 2010.
- TRINDADE, R. S. Melhoramento para resistência genética ao cretamento bacteriano comum em feijão comum e feijão-de-vagem: aspectos gerais, avanços, desafios e perspectivas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 2012.
- UMESHA, S. Phenylalanine ammonia-lyase activity in tomato seedlings and its relations to bacterial cankered disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p. 68-71, 2006.
- VAN LOON, L.C. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**. Dordrecht. 4:111-116, 1985.
- VIDHYASEKARAM, P. et al. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pf1 against *Xanthomonas oryzae* in rice leaves. **Phytoparasitica**, BetDagan, v.29, p.155-167, 2001.
- VIECELLI, C. A.; MOERSCHBÄCHER, T. Controle do cretamento bacteriano comum na cultura do feijoeiro pelo uso de fertilizantes foliares. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p.66-72, 2013.



VIEIRA, R. F.; CARVALHO, L. D. A. Espécies medicinais do gênero *Solanum* produtoras de alcaloides esteroidais. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.74, p.97-111, 1993.

VIEIRA, R. F. **Avaliação do teor de solasodina em frutos verdes de *Solanum mauritianum* Scop. Sob dois solos no estado do Paraná, Brasil**. 1989. 107p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1989.

VIGO-SCHULTZ, S. C. **Avaliação da indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijão vagem**. Unesp, 2008, 78p. Pós-graduação em agronomia, Botucatu, 2008.

VIGO, S. C. et al. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o cretamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.293-304, 2009.

WANDER, A. L. **Cultivo do feijão irrigado na região Noroeste de Minas Gerais**. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrigadoNoroesteMG/>>. Acesso em: 18 abr. 2015.

WALLEN, V. R. & JACKSON, H.R. Model for yield loss determination of bacterial blight of field beans utilizing infrared photography combined with field plot studies. **Phytopathology** 65: 942-948. 1975.

YOKOYAMA, L. P.; Cultivo do feijoeiro comum. **Embrapa Arroz e Feijão**. Dezembro, 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>> Acesso em 08/ abr./ 2015.

ZUCHIWSCHI, E. et al. Limitações ao uso de espécies florestais nativas pode contribuir com a erosão do conhecimento ecológico tradicional e local de agricultores familiares. **Acta bot. bras.** 24(1): 264-276. 2010.