

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

Fábio Junior Telaxka<sup>1</sup>, Jonas Marcelo Jaski<sup>2</sup>, Daniele Carla Scheffer<sup>3</sup>, Jéssica Tais Gebauer<sup>4</sup>, Gabriela Silva Moura<sup>5</sup>, Gilmar Franzener<sup>6</sup>

**RESUMO** – O fumo-bravo (*Solanum mauritianum*) é uma espécie 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 e fermentado de *S. mauritianum* no controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Constituíram tratamentos o extrato aquoso nas concentrações de 0, 1; 5; 10, 15 e 20%, bem como os fermentados de fumo-bravo com e sem a adição de açúcar mascavo a 3% com 5, 10, 15 e 20 dias de fermentação. Foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* sobre a bactéria, indução da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro. Em plantas de feijoeiro, em casa de vegetação, foi avaliada a severidade da doença em trifólios tratados e em não tratados. Também foram coletadas amostras foliares 72 horas após os tratamentos para determinação da atividade de polifenoloxidase (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL). Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. O extrato aquoso induz a síntese de faseolina e os fermentados reduzem significativamente o crescimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. O extrato aquoso e o fermentado reduzem a severidade do crestamento bacteriano em folhas tratadas. O extrato aquoso e o fermentado reduzem a severidade do crestamento bacteriano em folhas tratadas e induzem a atividade das enzimas POX e FAL. Os resultados indicam o potencial de derivados de fumo-bravo na proteção de plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum.

Palavras chave: controle alternativo, fenilalanina amônia-liase, fitoalexinas, polifenoloxidase, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

## **AQUEOUS AND FERMENTED EXTRACT OF *Solanum mauritianum* Scop FOR *Phaseolus vulgaris* L. PROTECTION TO THE COMMON BACTERIAL BLIGHT**

**ABSTRACT** – The *Solanum mauritianum* is a typically pioneer species, abundant in the Decidual Seasonal Forest of the Atlantic Forest. Although medicinal properties are attributed to it, little is known of its effect on plant diseases. Thus, the objective of this work was to evaluate the aqueous and fermented extract of *S. mauritianum* in the control of the common bacterial blight of common bean, caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. The aqueous extract was treated at concentrations of 0.1, 5; 10, 15 and 20%, as well as the wild-type fermented with and without the addition of 3% brown sugar with 5, 10, 15 and 20 days of fermentation. *In vitro* antimicrobial activity tests were carried out on the bacterium, induction of phytoalexin phaseolin in bean hypocotyls. In common bean plants, the severity of the disease was evaluated in treated

<sup>1</sup> Mestre em Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava-PR.

<sup>2</sup> Doutorando em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá-PR.

<sup>3</sup> Graduanda em Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Campus Laranjeiras do Sul - PR.

<sup>4</sup> Mestranda em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Campus Laranjeiras do Sul - PR.

<sup>5</sup> Pós-Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável (PNPD/Capes), Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Campus Laranjeiras do Sul - PR.

<sup>6</sup> Docente, Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Campus Laranjeiras do Sul - PR, gilmar.franzener@uffs.edu.br.



and untreated trifolia. Leaf samples were collected 72 hours after the treatments to determine the polyphenoloxidase (POX) and phenylalanine ammonia-lyase activity (FAL). The trials were conducted in a completely randomized design with four replicates. The aqueous extract induces phaseolin synthesis and the fermented ones significantly reduce the growth of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Aqueous and fermented extract reduce the severity of bacterial blight on treated leaves. The aqueous and fermented extract reduce the severity of bacterial blight on treated leaves and induce the activity of POX and FAL enzymes. The results indicate the potential of wild smoke derivatives in the protection of common bean plants to common bacterial blight.

**Keywords:** alternative control, phenylalanine ammonia-lyase, phytoalexins, polyphenoloxidase, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

## INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ter sua produção comumente afetada por diversas doenças (Bianchini et al., 2005). Dentre os problemas fitossanitários do feijoeiro, o crestamento bacteriano comum, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, representa a principal doença bacteriana da cultura no Brasil. É uma bacteriose que pode provocar redução de 10 a 70% na produção (Diaz, 2000). De acordo com Vigo et al. (2009), está é uma doença de difícil controle, de ocorrência comum e que pode ser transmitida por sementes. Além disso, há escassez de produtos que podem ser utilizados com eficiência no controle da doença.

A busca por métodos mais sustentáveis para proteção de plantas e de menor impacto ao ambiente e à saúde humana, tem levado ao desenvolvimento de pesquisas com intuito de obter produtos naturais eficientes no controle de doenças de plantas (Dayan et al., 2009). Dentre esses produtos naturais, tem merecido destaque os derivados de plantas, como os extratos e óleos essenciais (Kuhn et al., 2006). Esses derivados podem atuar na proteção de plantas a doenças por diversos mecanismos, incluindo a ação antimicrobiana direta sobre o fitopatógeno (Didwania et al., 2013; Kotan et al., 2013) ou a ativação de mecanismos de defesa nas plantas (Franzener et al., 2018). A ação tanto antimicrobiana como indutora de mecanismos de defesa em plantas por derivados vegetais deve-se a presença de compostos ativos nessas espécies, geralmente originários do metabolismo secundário. Entre os mecanismos de defesa da planta que podem ser ativados por derivados vegetais estão as fitoalexinas (Moura et al., 2014), que são compostos antimicrobianos de baixo peso molecular sintetizados pela planta (Ahuja et al., 2012). Entre outras respostas bioquímicas que podem ser ativadas nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos estão as enzimas

relacionadas a defesa vegetal, como as polifenoloxidasas e a fenilalanina amônia-liase (Barros et al., 2010).

Também outros derivados de plantas medicinais, como os hidrolatos, já tem demonstrado potencial no controle de doenças, tanto por ação direta sobre os fitopatógenos como induzindo mecanismos de defesa em plantas (Moura et al., 2014). No entanto, sobre alguns derivados, como os fermentados vegetais, ainda há poucos estudos. Há relatos de que a fermentação pode aumentar a atividade biológica de plantas medicinais (Hussain et al., 2016) O desenvolvimento de produtos naturais que auxiliem no controle de doenças bacterianas assumem ainda maior importância devido a escassez de produtos e as dificuldades de controle.

O fumo-bravo (*Solanum mauritianum*) 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 (Barroso, 1991). Embora seja uma espécie vegetal muito comum e conhecida, as pesquisas e resultados de aplicações práticas referentes ao uso de derivados dessa planta na agricultura ainda estão escassos. Contudo, alguns trabalhos publicados relatam a efetividade na utilização desses materiais, tais como Mdee et al. (2009) que verificaram que o extrato de folhas e frutos de *S. mauritianum*, assim como o de outras espécies, apresentam efeito inibitório sobre alguns fungos fitopatogênicos, e De León et al. (2013) que trabalhando com extrato fermentado de *Flourensia cernua* também constaram que o fermentado apresenta atividade inibitória sobre *Penicillium expansum* and *Fusarium oxysporum* (De León et al., 2013).

Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o uso de extrato aquoso e fermentados de fumo-bravo na proteção de plantas de feijoeiro ao crestamento

bacteriano comum, avaliando tanto o efeito sobre o fitopatógeno como na ativação de mecanismos relacionados a defesa vegetal.

### MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação climatizada na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul – PR.

#### Obtenção do fermentado e extrato aquoso de fumo-bravo

Para obtenção dos preparados, folhas frescas de fumo-bravo foram coletadas de plantas de ocorrência espontânea no município de Laranjeiras do Sul/PR, no período da manhã, em agosto de 2015. O extrato aquoso a 20% foi obtido através da trituração de 100 g de folhas frescas de fumo-bravo em liquidificador contendo 500 mL de água destilada por 30 segundos. Em seguida o material foi filtrado em gaze e em papel de filtro. Para obtenção de diferentes concentrações o extrato foi diluído em água destilada.

Para obtenção dos fermentados, as folhas frescas foram pesadas e cortadas em fragmentos homogêneos de aproximadamente 0,5 cm na proporção de 100 gramas de folha para cada 1000 mL de água destilada. Em seguida o material foi acondicionado em garrafas pet, capacidade de 2 L, por 5, 10, 15 e 20 dias no escuro a 25°C, com ou sem a adição de açúcar mascavo a 3%. Após o período de fermentação, o material foi filtrado em gaze e papel de filtro.

#### Isolamento, manutenção e preparo do inóculo do fitopatógeno

O isolado da fitobactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi obtido a partir de folhas sintomáticas de feijoeiro na região de Laranjeiras do Sul-PR. Esta foi 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 mantidas a 28°C em escuro por 48 horas 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 (Kuhn, 2006). A manutenção da bactéria por períodos prolongados foi realizada através de inoculação e re-isolamento em plantas de feijoeiro.

#### Ensaio de atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade direta dos fermentados e dos extratos aquosos sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, foi conduzido experimento em tubos de ensaio (capacidade 10 mL) para o qual cada tubo recebeu concentrações iguais do meio caldo nutriente e os respectivos tratamentos, totalizando o volume final de 5 mL por tubo. Em seguida os tubos de ensaio, contendo os tratamentos, foram autoclavados a 120 °C por 20 min. Após os tubos atingirem temperatura ambiente foi adicionado a cada tubo 100 iL de suspensão bacteriana com  $1 \times 10^8$  UFC (unidades formadoras de colônia) mL<sup>-1</sup>. Os tubos foram mantidos por 48 horas a 27 °C em escuro e após determinada a absorbância a 580 nm.

Foram avaliados os biofermentados (a 10%) com ou sem açúcar mascavo de 5, 10, 15 e 20 dias de fermentação, além de extrato aquoso a 0, 1, 5, 10, 15 e 20%.

#### Ensaio de indução de fitoalexina

A determinação da fitoalexina faseolina foi realizada com base na metodologia de Dixon et al. (1983), com algumas modificações. Sementes de feijoeiro da variedade Tuiuiu foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 3 minutos. Em seguida foram lavadas em água destilada estéril, semeadas em areia esterilizada por autoclavagem (120°C por uma hora a 1 atm) e mantidas em escuro a 24 °C durante nove dias. Após esse período, segmentos de hipocótilos estiolados com 5 cm foram destacados das plântulas, lavados em água estéril e mantidos sobre papel absorvente por 30 minutos. Quatro segmentos de hipocótilo (com aproximadamente 1 g) foram colocados em cada placa de Petri contendo papel de germinação umedecido com água destilada estéril. Em seguida os tratamentos foram pulverizados sobre os hipocótilos até ponto de escorrimento. As placas de Petri foram tampadas e mantidas a 24 °C em escuro por 48 h. Após esse período, os hipocótilos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de etanol 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 280 nm.

Em um primeiro bioensaio foi avaliado o extrato aquoso nas concentrações de 0, 1, 5, 10, 15 e 20%. Em outro bioensaio foram avaliados os fermentados



na concentração de 10%, com 0 (sem fermentação) 5, 10, 15 e 20 dias de fermentação, com ou sem adição de açúcar mascavo (3%).

### Efeito protetor em plantas de feijoeiro

Para avaliar o efeito protetor do extrato aquoso e fermentados sobre o crestamento bacteriano comum, plantas de feijoeiro variedade Tuiuiu foram cultivadas em vasos plásticos (capacidade de 2 litros) contendo 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, sob temperatura de  $25 \pm 2$  °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. Três dias após, foi realizada a inoculação com suspensão bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> no primeiro (tratado) e no segundo trifólio (não tratado). 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%.

Para a determinação da severidade do crestamento bacteriano comum no feijoeiro foi utilizada a escala diagramática adaptada por Azevedo (1997), sendo o resultado expresso em porcentagem de área foliar lesionada. Constituíram tratamentos fermentados com 15 dias com e sem a adição de açúcar mascavo, extrato aquoso a 10%, com e sem a adição de açúcar mascavo, além da testemunha água destilada.

### Avaliação de enzimas relacionadas à defesa em plantas de feijoeiro

Experimento nos moldes do anterior foi conduzido para avaliar o potencial efeito indutor de enzimas relacionadas a defesa nas plantas de feijoeiro pelos tratamentos. Nesse caso, os tratamentos foram aplicados quando as plantas atingiram o estágio V3/V4, com 30 dias após a semeadura. Os tratamentos utilizados foram os fermentados com 5, 10, 15 e 20 dias de fermentação sem e com adição de açúcar mascavo, extrato aquoso a 0, 1, 5, 10 e 15%. Os tratamentos foram pulverizados no primeiro trifólio das plantas até o ponto de escorrimento.

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

As amostras de tecido foliar foram maceradas em 4 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) contendo 1% (p/p) de PVP (Polivinilpirrolidona), em almofariz de porcelana. Os homogeneizados foram centrifugados a 14.500 g 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.

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  $\mu$ L do substrato e 100  $\mu$ 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 min<sup>-1</sup> g.p.f<sup>-1</sup> (grama de peso fresco).

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umeha (2006), na qual 100  $\mu$ L do extrato enzimático foram acrescidos de 400  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L de extrato enzimático e 900  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido trans-cinâmico. Os resultados foram expressos em microg de ácido trans-cinâmico h<sup>-1</sup> g.p.f<sup>-1</sup> (gramas de peso fresco).

### Análise dos resultados

Os resultados foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade para

dados qualitativos e análise de regressão para os diferentes tempos e concentrações utilizadas. As análises foram realizadas com auxílio do sistema computacional ASSISTAT versão 7.7. (Silva & Azevedo, 2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antibacteriana sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

O extrato aquoso de *S. mauritianum* apresentou efeito quadrático sobre a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Figura 1A). Pela equação de regressão, o ponto de máxima foi observado na concentração de 15,7%, indicando que houve incremento no desenvolvimento da bactéria em relação às menores concentrações. O extrato aquoso de plantas podem

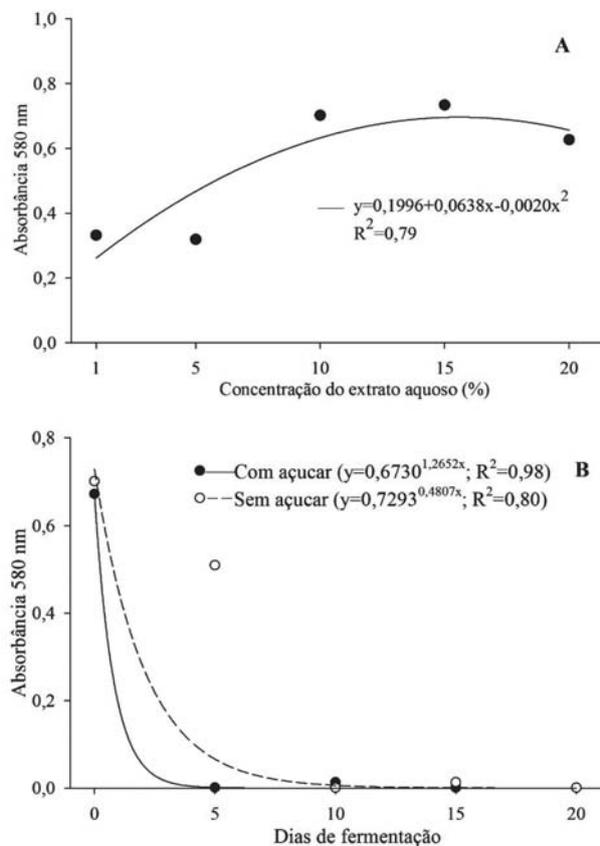


Figura 1 - Desenvolvimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* sob diferentes concentrações do extrato aquoso (A) e de biofermentados de fumo-bravo a 10% com e sem a adição de açúcar mascavo (B).

apresentar grande diversidade de compostos e com diferentes atividades biológicas, incluindo antimicrobianos, antioxidantes e mesmo estimulantes. Assim, é possível que o resultado das concentrações e interações entre esses compostos contribua para que o derivado vegetal possa apresentar maior ou menor efeito em diferentes concentrações.

No caso do uso dos fermentados de fumo-bravo os resultados foram mais expressivos, havendo inibição total do desenvolvimento microbiano a partir de cinco dias de fermentação quando incorporado açúcar mascavo a 3%, e a partir de 10 dias quando não houve a incorporação de açúcar (Figura 1B). Esse resultado demonstra o potencial da fermentação do extrato de fumo-bravo para potencializar o efeito inibitório sobre a bactéria. A incorporação do açúcar mascavo a 3% possivelmente acelerou o processo fermentativo, permitindo maior efeito antimicrobiano após 5 dias de fermentação. Incremento em propriedades farmacológicas e terapêuticas de plantas medicinais pela fermentação também já tem sido relatadas na literatura (Hussain et al., 2016).

Embora o potencial de extratos e óleos essenciais de plantas, principalmente medicinais, tem sido estudados nos últimos anos no controle fitossanitário (Kotan et al., 2013; Franzener et al., 2018), ainda são poucas as informações sobre o uso de fermentados vegetais. Como exemplo, Mdee et al. (2009) verificaram que extrato de algumas espécies vegetais de ocorrência espontânea, incluindo *S. mauritianum*, promoveram efeito inibitório sobre alguns fungos fitopatogênicos. Também De León et al. (2013) verificaram que o fermentado do extrato aquoso de *Flourensia cernua* apresentou atividade inibitória sobre os fungos *Penicillium expansum* e *Fusarium oxysporum*.

O efeito antimicrobiano de um produto natural representa um importante indicador de seu potencial no controle de determinada doença. No entanto, há situações em que mesmo sem ação antimicrobiana direta sobre o fitopatógeno pode haver controle da doença, possivelmente pela ativação de mecanismos de defesa vegetal (Silva et al., 2008). Também o fato de ser observada ação antimicrobiana *in vitro* pode não ser traduzido em controle efetivo da doença a campo (Kuhn et al., 2006), possivelmente pelos diversos fatores envolvidos nas condições *in vivo*.



### Indução de faseolina em feijoeiro

O extrato aquoso de fumo-bravo promoveu incremento de faseolina em hipocótilos de feijoeiro com o aumento na concentração utilizadas (Figura 2A). Esse resultado mostra o potencial em induzir essa fitoalexina pelo extrato de fumo-bravo.

Não foram encontrados trabalhos na literatura com a utilização de extrato de fumo-bravo na 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.

Quanto ao tempo de fermentação não foi observada diferença significativa no acúmulo de faseolina, tanto com ou sem a incorporação de açúcar mascavo nos fermentados de fumo-bravo a 10% (Figura 2B).

As fitoalexinas são compostos antimicrobianos produzidos pela planta como um importante mecanismo bioquímico de defesa. As mais estudadas são as deoxiantocianidinas em sorgo e a gliceolina em soja (Ahuja et al., 2012; Moura et al., 2014), comumente relacionadas com a redução na severidade de doenças em plantas.

### Efeito protetor em plantas de feijoeiro

A severidade do crestamento bacteriano nas plantas de feijoeiro foi reduzida com a aplicação dos tratamentos em relação a testemunha tratada apenas com água destilada, a qual apresentou 10,6% de área foliar lesionada (Tabela 1). No entanto, a diferença entre os tratamentos foi observada somente nos trifólios tratados (primeiro trifólio).

Os tratamentos que propiciaram menor severidade da doença foram o extrato aquoso a 10%, com e sem adução de açúcar mascavo, e o fermentado de fumo-bravo com 15 dias de fermentação com açúcar mascavo a 3%. O fermentado sem açúcar apresentou valores intermediários de severidade, não diferindo da testemunha água e do fermentado com açúcar. Os resultados demonstram efeito protetor ao crestamento bacteriano em plantas de feijoeiro tanto pelo extrato aquoso como pelo fermentado.

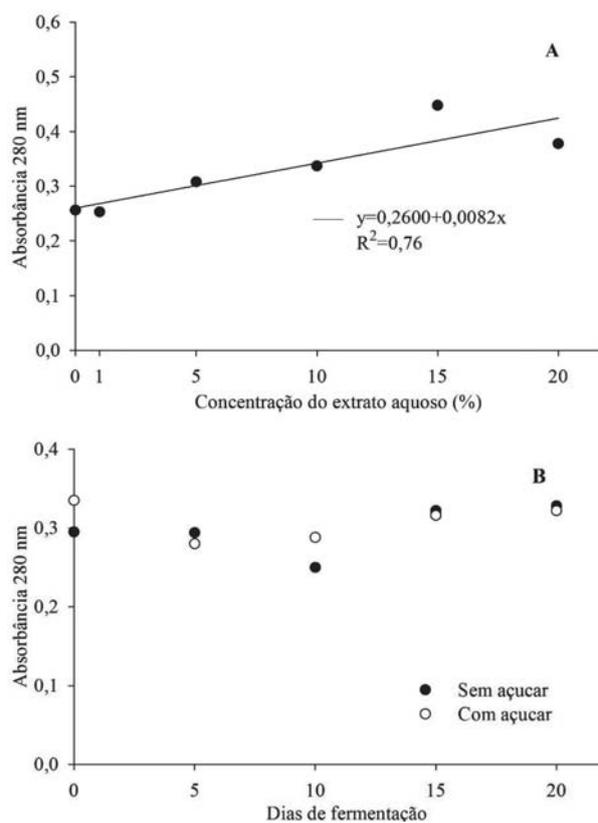


Figura 2 - Teor de faseolina em hipocótilos de feijoeiro tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso (A) e de fermentados a 10% (B) de fumo-bravo com ou sem adição de açúcar.

Nos segundos trifólios das plantas, que não receberam os tratamentos, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha. No entanto, um dos resultados de maior destaque é o valor significativamente menor da severidade da doença na testemunha água no trifólio não tratado em relação ao trifólio tratado com água. Possivelmente o fato de ter ocorrido menor severidade da doença em trifólios não tratados em relação aos tratados com água destilada não se refere a efeito sistêmico mas sim a fatores intrínsecos da própria planta. Possivelmente contribua para isso o fato de o segundo trifólio (não tratado) ser mais jovem que o primeiro trifólio, podendo apresentar composição distinta, como maior compostos antimicrobianos, por exemplo.

Ainda pouco se sabe sobre o efeito de derivados de fumo-bravo na proteção de plantas. Devido a

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

Tratamentos	Severidade (%)	
	1º trifólio	2º trifólio
Água destilada	10,6 aA	1,8 aB
EA 10% sem açúcar	2,6 bcA	1 aA
Fermentado sem açúcar por 15 dias	6,6 abA	2 aB
EA 10% com açúcar	1 cA	0,4 aA
Fermentado com açúcar por 15 dias	3 bcA	1,2 aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

importância do crestamento bacteriano comum no feijoeiro, outras alternativas já foram avaliadas e demonstraram efeitos promissores. Um exemplo é o trabalho desenvolvido por Silva et al. (2008) em que observaram o controle biológico de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* por um isolado de *Pseudomonas*. Nesse trabalho os autores verificaram o controle da doença mesmo sem haver a inibição direta do fitopatógeno, sugerindo, nesse caso, o envolvimento de indução de resistência. Esse efeito possivelmente ajuda a explicar o fato de o extrato aquoso de *S. mauritianum* não ter promovido efeito inibitório sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli* mas ter reduzido a severidade da doença.

Redução da severidade do crestamento bacteriano comum 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<sup>-1</sup>) e acibenzolar-S-metil (75 mg i.a. L<sup>-1</sup>). Diaz et al. (2000) também relataram que a severidade da doença não apresenta relação linear significativa com a produção, no entanto, observaram que a duração da área foliar sadia relacionou-se linearmente de forma significativa ( $P < 0,01$ ) com a produção em duas diferentes variedades. Redução na severidade do crestamento bacteriano comum em feijoeiro também foi observado por Vigo et al. (2009) avaliando óleos essenciais e tinturas de outras espécies vegetais, também sugerindo o envolvimento de mecanismos de defesa vegetal ativados em função dos tratamentos.

#### Atividade da polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase

O fermentado de fumo-bravo sem açúcar não proporcionou aumento da atividade da enzima polifenoloxidasas (Figura 3A). O tratamento promoveu redução na atividade da enzima no primeiro trifólio do feijoeiro nos tempos intermediários de fermentação,

sendo demonstrado pela equação quadrática. No segundo trifólio não houve diferença entre os dias de fermentação do preparado para atividade dessa enzima.

Quando utilizado o biofermentado de fumo-bravo com açúcar foi observado efeito quadrático tanto em trifólios tratados como não tratados, havendo redução na atividade em tempos de fermentação intermediários e aumento na atividade dessa enzima nos maiores tempos de fermentação. O fermentado com 20 dias de fermentação em folhas tratadas promoveu incremento de até 276% na atividade da enzima em relação ao tratamento sem fermentação (0). Já em trifólios não tratados não houve aumento na atividade de polifenoloxidasas em relação ao tratamento sem fermentação (Figura 3 B).

Com a aplicação do extrato aquoso sobre as folhas do feijoeiro e análise após 72 horas, houve efeito indutor na atividade da polifenoloxidasas em trifólios tratados (Figura 3 C).

Esses resultados evidenciam que tanto o extrato aquoso como o fermentado possuem compostos indutores da síntese dessa enzima em folhas de feijoeiro. No entanto, essa atividade indutora se restringe ao efeito local, não apresentando efeito sistêmico em folhas não tratadas. As polifenoloxidasas envolvem a degradação oxidativa de compostos fenólicos levando a polimerização de quinonas (Barros et al., 2010), assim a sua indução torna-se importante para defesa vegetal. Em feijoeiro essa enzima também já foi associada a redução na severidade da antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Campos et al., 2004) bem como do crestamento bacteriano comum (Vigo et al., 2009).

Quanto a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase, os fermentados de fumo-bravo, tanto sem (Figura



4A) como com (Figura 4B) a adição de açúcar mascavo promoveram alterações na atividade dessa enzima. Os fermentados com maior tempo de fermentação (20 dias) promoveram maior atividade de fenilalanina amônia-liase em folhas tratadas. Já no segundo trifólio (não tratado) houve efeito quadrático com indução dessa

enzima em tempos intermediários de fermentação, tanto com como sem a adição de açúcar (3%).

Quando foram utilizadas diferentes concentrações do extrato aquoso de fumo-bravo houve aumento linear significativo na atividade de fenilalanina amônia-liase com o aumento na concentração do extrato em trifólios

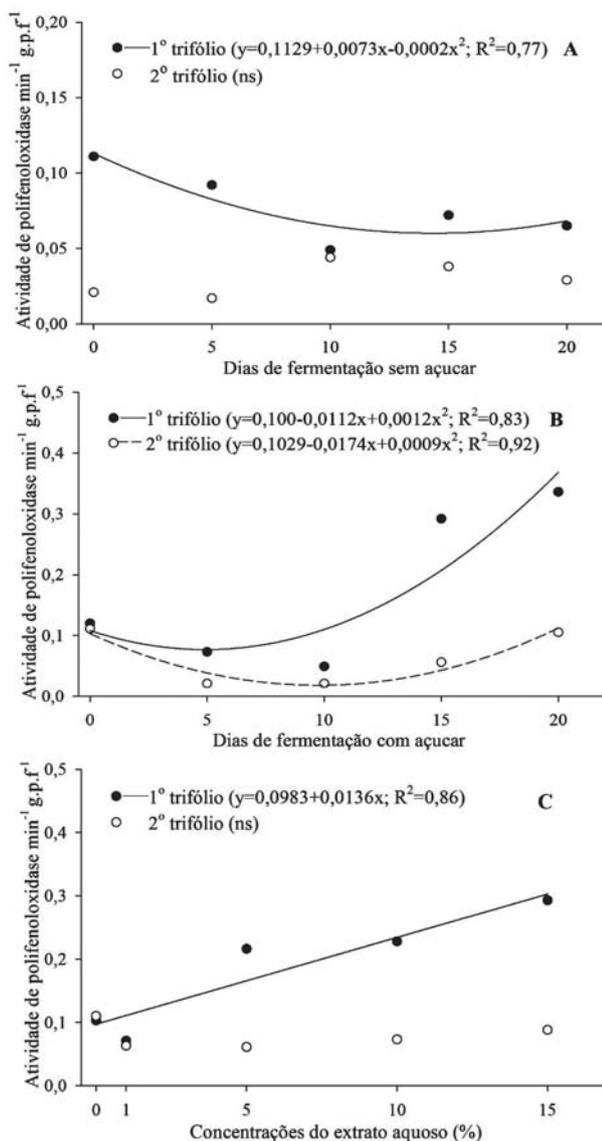


Figura 3 - Atividade da polifenoloxidase com a utilização de fermentados sem (A) e com (B) adição de açúcar mascavo, ou uso de extrato aquoso (C) de fumo-bravo após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada. ns: não significativo.

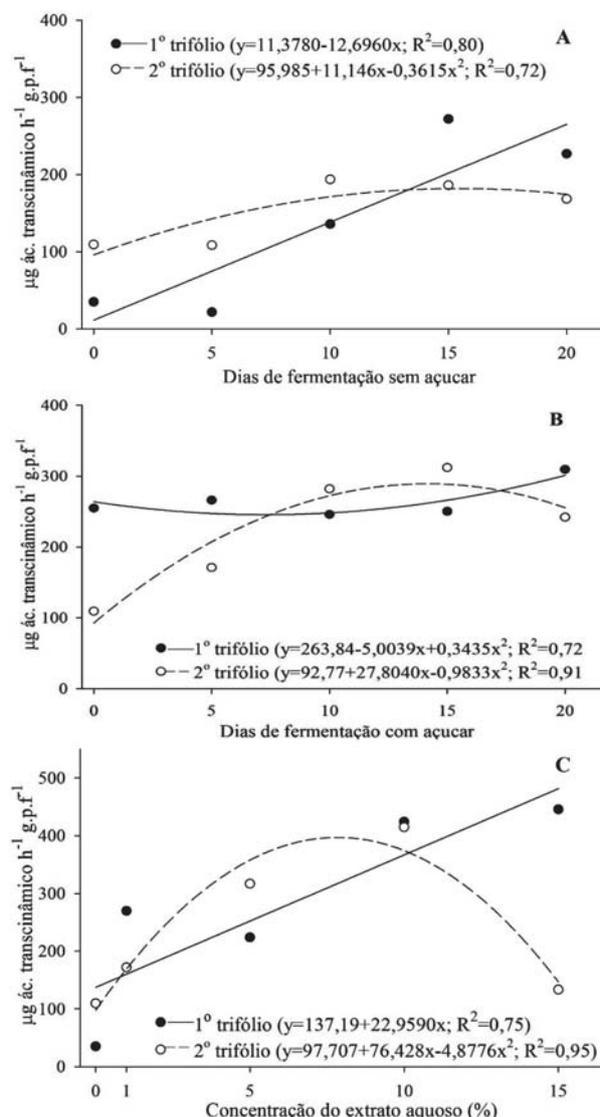


Figura 4 - Atividade da fenilalanina amônia-liase com a utilização de fermentados sem (A) e com (B) adição de açúcar mascavo, ou diferentes concentrações do extrato aquoso (C) após 72 horas na 1ª e 2ª folha trifoliada.

que receberam os tratamentos (Figura 4C). Já em trifólios não tratados também houve incremento na atividade dessa enzima mas em concentrações intermediárias, tendo ponto de máxima na concentração de 7,8% do extrato. Os resultados obtidos demonstram que tanto o fermentado como o extrato aquoso possuem compostos com efeito indutor dessa enzima, tanto em folhas tratadas como em folhas não tratadas, indicando potencial efeito sistêmico. No entanto, efeito indutor em folhas não tratadas foram observados somente em concentrações ou tempos de fermentação intermediárias, para o extrato aquoso e fermentados, respectivamente.

Os resultados obtidos com aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase são importantes indicadores do potencial efeito indutor de resistência em plantas de feijoeiro pelo extrato e fermentado de fumo-bravo, uma vez que essa enzima possui uma papel muito importante na ramificação do metabolismo primário para formação de metabólitos secundários em plantas. Alguns trabalhos já tem relacionado o aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase com a redução na severidade de doenças. Ao trabalhar com arroz induzido com *Pseudomonas fluorescens* contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryza*, Vidhyasekaram et al. (2001) observaram redução na severidade da mancha bacteriana em 85% associado ao aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase. O potencial efeito indutor de polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase já foi relatado em diferentes culturas por derivados vegetais de outras espécies (Vigo et al., 2009; Franzener et al., 2018).

Considerando a importância das polifenoloxidasas e de fenilalanina amônia-liase na defesa vegetal e a indução das mesmas pelo extrato aquoso e fermentado de fumo-bravo, os resultados sugerem que a proteção de plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum por esses derivados vegetais envolve também a indução de resistência nas plantas.

### CONCLUSÕES

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

Os fermentados apresentam efeito antibacteriano sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, o que já não ocorreu com uso do extrato aquoso. Os fermentados e o extrato

aquoso reduzem a severidade do crestamento bacteriano em folhas de feijoeiro bem como promovem incremento na atividade de polifenoloxidasas (de forma local) e fenilalanina amônia-liase (de forma sistêmica), indicando potencial efeito indutor de resistência nas plantas.

### LITERATURA CITADA

- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. et al. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in plant science**, v.17, n.2, p.73-90, 2012.
- AZEVEDO, L. A. S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo.1997.
- BARROS, F. C.; SAGATA, É.; FERREIRA, L. C. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- BARROSO, G. M. Família Solanaceae Wettstein. In. **Sistemática de angiospermas de Brasil**. São Paulo. 1991. p. 62-74.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. P. G. et al. Doenças do feijoeiro. In KIMATI et al., **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ceres, p.333-351, 2005.
- BRAND, S.C.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B. et al. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, v.40, n.9, p.1881-1887, 2010.
- CAMPOS, Â. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.
- DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, n.12, p.4022-4034, 2009.
- DE LEÓN, M.A., SÁENZ, A.; JASSO-CANTU, D. et al. Fermented *Flourensia cernua* extracts and their *in vitro* assay against *Penicillium expansum* and *Fusarium oxysporum*. **Food Technology and Biotechnology**, v.51, p.233-239, 2013.



- 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.
- DIDWANIA, N.; SADANA, D.; TRIVEDI, P. C. Antibacterial activity of a few medicinal plants against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **International Journal Research in Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.2, p.177-182, 2013.
- DIXON, R. A.; DEY, P. M.; LAWTON, M. 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**, v.64, p.351-359, 1999.
- FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MOURA, G. S. et al. Induction of defense enzymes and control of anthracnose in cucumber by *Corymbia citriodora* aqueous extract. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, p.10-16, 2018.
- HUSSAIN, A.; BOSE, S.; WANG, J.-H. et al. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines. **Food Research International**, v.81, p.1-16, 2016.
- KOTAN, R.; DADASOĐLU, F.; KARAGOZ, K. et al. Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. **Scientia Horticulturae**, v.153, p.34-41, 2013.
- KUHN, O.J.; PORTZ, R.L.; STANGARLIN, J.R. et al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.1, p.13-20, 2006.
- MDEE, L. K.; MASOKO, P.; ELOFF, J. N. The activity of extracts of seven common invasive plant species on fungal phytopathogens. **South African Journal of Botany**, v.75, n.2, p.375-379, 2009.
- MOURA, G. S.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. et al. Atividade antimicrobiana e indutora de fitoalexinas do hidrolato de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 309-315, 2014.
- SILVA, E. G.; MOURA, A. B.; DEUNER, C. C. et al. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Revista Ceres**, v.55, n.5, p.377-383, 2008.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.
- 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.
- VIDHYASEKARAM, P. et al. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pfl against *Xanthomonas oryzae* in rice leaves. **Phytoparasitica**, 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.
- VIGO, S.C.; MARINGONI, A.C.; CAMARA, R.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.

Recebido para publicação em 21/7/2018 e aprovado em 27/9/2018.

