EUGENOL NA INDUÇÃO DA FITOALEXINA FASEOLINA NA cultura do FEIJoeiro (*Phaseolus vulgaris* L*.*)

**RESUMO**

O aumento expressivo da cadeia produtiva ocorre juntamente com o objetivo de produzir alimentos com menores níveis de resíduos químicos e maior qualidade dos produtos. Um dos mecanismos de defesa vegetal, induzida por atividades elicitoras é a biossíntese de fitoalexinas. As fitoalexinas são metabólitos secundários produzidos pela planta no local da infecção. Como contribuição ao tema, este trabalho teve como objetivo induzir a produção da faseolina no feijoeiro utilizando o eugenol como agente elicitor, pois o mesmo já é conhecido por suas ações fungicida e bactericida. A metodologia aplicada foi adaptada e baseia-se em técnicas químicas e analíticas visando a indução da faseolina na planta do feijoeiro através do agente elicitor eugenol. Uma vez induzida, a faseolina foi extraída em álcool etanol e sua leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS a 280nm. Após o uso do eugenol na planta do feijoeiro, a produção de faseolina apresentou ganhos significativos de 322% em relação ao controle negativo (água) e de 245% em relação ao controle positivo (Bion®). De acordo com os resultados obtidos, confirmou-se que o eugenol possui ação elicitora sobre a planta do feijoeiro, pois induziu a produção da fitoalexina faseolina.

**Palavras-chave:** Biossíntese. Defesa Vegetal. Metabólitos Secundários. Elicitor.

**ABSTRACT**

The expressive increase in the production chain comes along with the goal of producing foods with lower levels of chemical residues and higher quality products. One of the plant defense mechanisms induced by elicitor activities is phytoalexin biosynthesis Phytoalexins are secondary metabolites produced by the plant at the site of infection. As a contribution to the theme, this study aimed to induce the production of phaseolin in common beans using eugenol as an elicitor, as it is already known for its fungicidal and bactericidal actions. The applied methodology was adapted and is based on chemical and analytical techniques aiming the phaseoline induction in the bean plant through the eugenol elicitor agent. Once induced, the phaseoline was extracted in ethanol ethanol and read on a 280nm UV-VIS spectrophotometer. After the use of eugenol in the bean plant, the phaseoline production showed significant gains of 322% in relation to the negative control (water) and 245% in relation to the positive control (Bion®). According to the results obtained, it was confirmed that eugenol has an eliciting action on the bean plant, as it induced phytoalexin phaseolin production.

**Key words:** Biosynthesis. Plant defense. Secondary metabolites. Elicitor.

I**NTRODUÇÃO**

Pesquisas, cujo objetivo é a produção de alimentos isentos de resíduos de defensivos agrícolas, têm demonstrado o potencial de métodos naturais no controle de fitopatógenos, como, por exemplo, o controle biológico da podridão radicular do abacateiro com *Trichoderma* spp. e *Pseudomonas fluorescens* [1], o uso de isolado bacteriano *Bacillus subtilis* na supressão do crescimento de fungos deterioradores nas sementes de *Butia purpurascens* [2] e a aplicação de extrato de própolis no controle de *Erwinia carotovora* subsp em batata [3].

Dentre os produtos naturais no controle de fitopatógenos, as fitoalexinas, segundo Stangarlin et al.[4], são compostos fenólicos com capacidade de inibir os microrganismos que infestam as plantas. Acrescentam que esses compostos não são encontrados em plantas saudáveis, pois somente são sintetizados nas plantas, por exemplo, após infecção, lesão ou por estímulos de certas secreções fúngicas.

As fitoalexinas também podem ser induzidas por meio de elicitores, como os extratos e os óleos essenciais[5]. Os indutores de fitoalexinas são efetivos contra diversos patógenos; são estáveis devido a ação de diferentes mecanismos de resistência e possuem caráter sistêmico[6].

Frações parcialmente purificadas obtidas de extratos brutos metanólico de *Cymbopogon nardus* apresentam potencial para induzir o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo[5]. Silva et al. [7] demonstraram a eficiência de elicitores de resistência bióticos e abióticos no manejo da antracnose na videira.

Apesar das doenças serem um dos principais fatores responsáveis pela queda de produtividade no feijoeiro, podendo provocar perdas de até 100% da produção e diminuição das qualidades fisiológicas, nutricionais e sanitárias do produto colhido [8], o feijoeiro também apresenta sistemas de defesa contra patógenos[9].

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo, induzir a produção da fitoalexina faseolina na cultura do feijoeiro, utilizando o eugenol como agente elicitor e por meio de análise espectrofotométrica quantificar em absorbância a produção da faseolina.

**MATERIAL E MÉTODOS**

A metodologia aplicada foi adaptada de Dixon et al. [10] e baseia-se em técnicas químicas e analíticas que visam a indução da faseolina na planta do feijoeiro. O eugenol foi utilizado como agente elicitor A extração da faseolina foi realizada através de etanol e as leituras de absorbância foram definidas através do espectrofotômetro UV-VIS a 280nm, para quantificação.

Entre a etapa de indução da faseolina e a etapa de extração, houve a contagem das sementes não germinadas para avaliação da taxa de germinação. Nessa fase também ocorreu a medição dos hipocótilos para avaliação da uniformidade de crescimento.

A indução e a extração da faseolina foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade Cantareira, no município de São Paulo, estado de São Paulo. A leitura das Absorbâncias, utilizando o espectrofotômetro UV-VIS, foi realizada no Laboratório de Química na Universidade Federal do ABC, município de Santo André, estado de São Paulo.

**Indução da faseolina**

Em balões de 50mL, foram preparadas soluções com eugenol diluído em água nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mL. L-1, acrescidas de 0,2% do agente emulsificante (Tween 20) v/v.

As sementes de feijão foram selecionadas, esterilizadas em hipoclorito de sódio 1% por cinco minutos e lavadas em água destilada.

Para cada tratamento foram selecionadas 50 sementes de feijão divididas em cinco repetições com 10 sementes cada. Foram gotejados 0,25 mL da solução com eugenol de cada tratamento em todas as sementes e, logo após, foram semeadas em recipientes, utilizando como substrato, algodão umedecido.

Como testemunha positiva foi utilizado o indutor de defesa vegetal Acibenzolar-S-metil (Bion®) e como testemunha negativa foi utilizado água. Conforme indicação do fabricante, expresso na bula do produto, o preparo da solução no volume de calda (25g.250 L-1) serviu como base de cálculo para o preparo da testemunha positiva, Bion na concentração de 100 ppm. Também foi verificada uma possível ação elicitora do preparado de Tween 20, diluído a 0,2% em água, o Tween 20 foi utilizado como emulsificante no preparo dos tratamentos.

Após a semeadura, os recipientes foram mantidos a temperatura ambiente (mínima de 19ºC e máxima de 28°C) e ao abrigo de luz por período de seis dias. Nas primeiras 48 horas, os recipientes foram umedecidos diariamente com 3 mL de água cada. Nas 48 horas seguintes, não houve adição de água e os recipientes foram mantidos no local com as mesmas condições de temperatura e luminosidade. Após o período de estresse hídrico, nas 48 horas seguintes, os recipientes foram umedecidos uma única vez com 3 mL de água cada.

**Extração e quantificação da faseolina**

Após seis dias de germinação, houve a contagem das sementes não germinadas, os hipocótilos das plantas foram medidos e os quatro maiores, dentro das repetições, foram selecionados para retirada de segmentos no tamanho de cinco centímetros por hipocótilo. Os quatro segmentos retirados de cada repetição foram pesados, acondicionados em papel de filtro, embebidos com 5 mL da respectiva solução tratamento (eugenol 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mL. L-1; Bion 100ppm e Tween 0,2%) e mantidos em placa de petri a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 48 horas.

Após dois dias, os hipocótilos de cada tratamento foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de etanol e mantidos em geladeira (2°C - 8°C), por 40 horas. Após esse período, cada tubo contendo seus respectivos tratamentos foram agitados (agitador orbital a 300 rpm) por uma hora para extração da faseolina.

A curva de calibração foi montada a partir das soluções padrões de albumina nas concentrações 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 e 0,175% onde foi definida a equação da reta (Equação 1), utilizada para calcular as concentrações da faseolina em porcentagem.

A absorbância foi mensurada a 280nm na faixa do UV, através de espectrofotômetro UV-VIS[10].

$y=6,1079x-0,0068$ Equação 1

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo Teste Tukey, em nível de 5 % de probabilidade.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos foram comparados para determinação da ação elicitora do eugenol sobre a planta do feijoeiro.

Após seis dias de germinação, foi verificado que algumas sementes não germinaram e entre as plântulas germinadas, os hipocótilos estiolados não apresentaram uniformidade de tamanho, conforme pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Tamanho médio dos hipocótilos de feijão em cada uma das cinco repetições conforme respectivo tratamento.

|  |  |
| --- | --- |
| Tratamentos | Média dos tamanhos (cm) |
| **1ª repetição** | **2ª repetição** | **3ª repetição** | **4ª repetição** | **5ª repetição** |
| Água | 6,8 | 5,6 | 6,8 | 8,2 | 9,3 |
| Tween | 4,8 | 7,0 | 7,8 | 6,6 | 7,8 |
| Bion | 8,5 | 8,0 | 7,0 | 6,2 | 3,4 |
| Eugenol 0,1% | 5,07 | 5,26 | 4,78 | 4,72 | 7,05 |
| Eugenol 0,2% | 6,04 | 6,34 | 5,57 | 6,53 | 8,09 |
| Eugenol 0,2% | 7,73 | 6,1 | 6,52 | 4,64 | 6,22 |

Na Figura 1, pode-se visualizar que não houve grande diferença na taxa de germinação, exceto com o tratamento eugenol 0,1%.

 Figura 1. Porcentagem de germinação das sementes de feijoeiro, mantidos em temperatura ambiente (19– 28°C) e ao abrigo de luz por seis dias, conforme tratamentos.

Os resultados analíticos foram obtidos em absorbância e as massas dos hipocótilos foram utilizadas para correção em absorbância/grama de peso fresco (Abs.gpf-1). Foi verificado que todos os tratamentos foram capazes de induzir a produção da faseolina nas plântulas do feijoeiro (Tabela 2).

**Tabela 2.** Produção de faseolina obtida em porcentagem de concentração.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Tratamentos | Média Concentração (%) | Média (Abs.gpf-1) |
| Água | 0,09 b | 0,526 |
| Tween | 0,10 b | 0,626 |
| Bion | 0,11 b | 0,637 |
| Eugenol 0,1 % | 0,27 a | 1,661 |
| Eugenol 0,2 % | 0,31 a | 1,906 |
| Eugenol 0,3 % | 0,38 a | 2,325 |

FONTE: O autor (2019).

Os resultados analíticos das soluções controle positivo e negativo (Bion e água), demonstraram valores próximos quanto a produção de faseolina no feijoeiro (concentração de 0,11% e 0,09% respectivamente), já nos tratamentos que foram utilizadas as soluções; eugenol 0,1%, 0,2% e 0,3% não houve diferença significativa entre esses valores (0,27%, 0,31% e 0,38% respectivamente), porém, se apresentaram de três a quatro vezes superiores comparando-se com os tratamentos de controle positivo e negativo.

Ao comparar a produção de faseolina no melhor cenário (eugenol 0,3%) com a faseolina encontrada no controle negativo (água), identificou-se um aumento significativo de 322% na produção de faseolina e ainda mais, se a mesma comparação, for realizada entre o eugenol 0,3% com o produto referência (Bion®), será encontrado um aumento de 245% na produção de faseolina, enquanto Oliveira et al. [11], testando preparados homeopáticos, verificaram aumento médio de 28,62% na produção de faseolina em plantas tratadas com óleo de *Eucalyptus citriodora* na dose 1% e 24CH.

Brand et al. [12] obtiveram em seus estudos com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na dose de 3,0%; a maior absorbância de 1,54: No presente estudo, a maior média de absorbância encontrada foi de 2,39 com o preparado de eugenol 0,3%.

Ao levar em conta a correção do resultado de absorbância em absorbância/ grama de peso fresco (Abs.gpf-1), utilizando o peso das massas de hipocótilos, a melhor média encontrada foi de 2,32 Abs.gpf-1, com o tratamento eugenol 0,3%. Oliveira et al.[11], utilizando preparados homeopáticos de *Eucalyptus citridora*, obtiveram valor de 0,352 Abs.gpf-1 enquanto Zubek et al. [13] estudaram a influência da prata coloidal na produção de faseolina em hipocótilos de feijão e encontraram o seu melhor resultado (2,0 Abs.gpf-1), quando utilizaram o preparado de prata coloidal a 5%.

A respeito da presença de faseolina nas plântulas tratadas com o controle negativo (água) e o agente emulsificante (Tween), nota-se que essa ocorrência foi devido ao estresse pelo qual as sementes e as plântulas foram submetidas, assim como aconteceu em todos os demais tratamentos.

**CONCLUSÃO**

Ao utilizar o concentrado de eugenol 0,3%; houve um aumento significativo na produção de faseolina, o que pode ser um indicador de que o eugenol é um agente elicitor da planta do feijoeiro.

Sugere-se ainda que estudos avaliando a utilização in vivo devem ser realizados para comprovar sua eficiência.

**REFERÊNCIAS**

1. Sumida CH, Fantin LH, Braga K, Canteri MG, Homechin M. Control of root rot (*Phytophthora cinnamomi*) in avocado (*Persea Americana*) with bioagents. **Summa Phytopathol**. 2020; 46(3): 205-211. ISSN: 1980-5454. <https://www.scielo.br/pdf/sp/v46n3/1980-5454-sp-46-3-0205.pdf>.

2. Oliveira JC, Sales JF, Rubio-Neto A, Silva CF, Soares MA, Silva FG. Biological control in the germination of seeds from two species native of the Cerrado region. **Braz. J. Biol.** 2020; 81(1):105-113. ISSN: 1678-4375. <https://www.scielo.br/pdf/bjb/v81n1/1519-6984-bjb-1519-6984222279.pdf>.

3. Sampietro DA, Sampietro MSB, Vattuone MA. Efficacy of Argentinean propolis extracts on control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. **J Sci Food Agric. 2020 Sep;100(12):4575-4582.** ISSN: 1097-0010.<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jsfa.10516>**.**

4. Stangarlin JR, Kuhn OJ, Toledo MV, Portz RL, Schwan-Estrada KRF, Pascholati SF. A Defesa vegetal contra fitopatógenos. **Sci. Agrar. Paran.** 2011; 10:18–46. ISSN: 1983-1471. <http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/download/5268/3929>.

5. Moreira CGÁ, Schwan-Estrada KRF, Bonaldo SM, Stangarlin JR, Cruz, MES. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa phytopathol.** 2008; 34(4):332-337. ISSN: 1980-5454. <https://www.scielo.br/pdf/sp/v34n4/v34n4a06.pdf>.

6. Guimarães LMP, Pedrosa EMR, Coelho RSB, Couto EF, Maranhão SRVL, Chaves A. Eficiência e atividade enzimática elicitada por metil jasmonato e silicato de potássio em cana-de-açúcar parasitada por *Meloidogyne incognita*. **Summa phytopathol.** 2010; 36(1): 11-15. ISSN: 1980-5454. <https://www.scielo.br/pdf/sp/v36n1/01.pdf>.

7. Silva HF, Pinto KMS, Nascimento LC, Silva EC, Souza WCO. Avaliação do uso de elicitores de resistência bióticos e abióticos contra a antracnose na videira (*Vitis labrusca* L.). **Summa Phytopathol.** 2019, v.45(1): 70-75. ISSN: 1980-5454. <https://www.scielo.br/pdf/sp/v45n1/0100-5405-sp-45-1-0070.pdf>.

8. Biazon VL. Crestamento bacteriano comum do feijoeiro: efeito da adubação nitrogenada e potássica e aspectos bioquímicos relacionados à doença. 2003. 172 f. Tese [Doutorado em Agronomia] Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu. 2003.

9. Braga MR. **Fitoalexinas e a Defesa das Plantas**. Instituto de Botânica, SMA, São Paulo, 2015. <https://www.researchgate.net/publication/266282236_Fitoalexinas_e_a_Defesa_das_Plantas>.

10. Dixon RA, Dey PM, Lawton MA, Lamb CJ. Phytoalexin Induction in French Bean. **Plant Physiol**. 1983; 71(2): 251–256. ISSN: 1532-2548. http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/71/2/251.full.pdf

11. Oliveira JSB, Maia AJ, Schwan-Estrada KRF, Carneiro SMTPG, Bonato CM. Indução de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro por preparados homeopáticos de Eucalyptus citriodora. Cadernos de Agroecologia. 2011, 6(2). ISSN: 2236-7934. <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/cad/article/view/12662>.

12. Brand SC, Blume E, Muniz MFB, Milanesi PM, Scheren MB, Antonello LM. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre Colletotrichum lindemuthianum. Cienc. Rural. 2010; 40(9), 1881-1887. ISSN: 0103-8478. <https://www.scielo.br/pdf/cr/v40n9/a715cr2265.pdf>.

13. Zubek L, Silva JB, Mizuno MS, Hisano LK, Bonato CM, Schwan-Estrada KRF. Prata coloidal como inductor de faseolina em hipocótilos de feijão. In: ANAIS DO ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 2017, **Anais eletrônicos**... Campinas, Galoá, 2017. <https://proceedings.science/epcc/papers/prata-coloidal-como-indutor-de-faseolina-em-hipocotilos-de-feijao>.