



**Potencial indutor de fitoalexinas em feijão e soja por formulado a base de alecrim +
*Lithothamnium***

**Potential inducing phytoalexins in bean and soybean by formula based on rosemary +
*Lithothamnium***

Vanessa de Oliveira Faria¹, Luane Laíse Oliveira Ribeiro², Bruno Fernandez Godinho³, Bruno Borges da Silveira⁴, Marcos Vinícius Simon⁵, José Renato Stangarlin⁶.

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon-PR, e-mail: wanessa_olfr@hotmail.com, 2. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, e-mail: luanelaiseifpa@hotmail.com, 3. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon-PR, e-mail: brunofergodinho@gmail.com, 4. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon-PR, e-mail: brunnoborges58@gmail.com, 5. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon-PR, E-mail: marcosvsimon@gmail.com, 6. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon-PR, e-mail: marcosvsimon@gmail.com

Resumo - Diversas substâncias podem ativar os mecanismos de defesa vegetal, atuando como indutores de resistência contra patógenos. O extrato de alecrim tem sido utilizado para controle de doenças de plantas e enriquecido com o cálcio da alga *Lithothamnium* tem seu potencial bioativo melhorado, atuando como indutores de resistência contra patógenos. O trabalho objetivou-se verificar o potencial do formulado de alecrim + *Lithothamnium* na indução de mecanismos de defesa da soja e feijão. O experimento foi conduzido através do Delineamento Inteiramente Casualizados (DIC), com cinco repetições. Os respectivos tratamentos foram: 0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹ do formulado alecrim + *Lithothamnium* (produto comercial), preparadas pela dissolução do produto em água destilada. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão. O formulado a base de alecrim + *Lithothamnium* obteve potencial para indução da fitoalexina faseolina no feijão e gliceolina na soja.

Palavras-chave: faseolina; gliceolina; mecanismo de defesa.

Abstract - Several substances can activate plant defense mechanisms, acting as resistance inducers against pathogens. The rosemary extract has been used to control plant diseases and enriched with calcium from the *Lithothamnium* seaweed has its bioactive potential improved, acting as resistance inducers against pathogens. The objective of this work was to verify the potential of the rosemary + *Lithothamnium* formulation in the induction of defense mechanisms in soybeans and beans. The experiment was carried out using a completely randomized design (DIC), with five replications. The respective treatments were: 0, 100, 200, 300, 400 and 500 mg L⁻¹ of the formulated rosemary + *Lithothamnium* (commercial product), prepared by dissolving the product in distilled water. The results were submitted to analysis of variance and regression. The formula based on rosemary + *Lithothamnium* had potential for inducing phytoalexin phaseolin in beans and glycolin in soybeans.



Keywords: faseolin; glyceolin; defense mechanism.

Introdução

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) sempre teve grande importância econômica e social para a agricultura brasileira, onde o país é um dos maiores produtores e consumidores mundiais desta leguminosa, sendo esta a principal fonte proteica da população, em especial a de baixo poder aquisitivo (MELO FILHO, 2008). No Brasil, a área cultivada com essa cultura é de aproximadamente 2.972,8 mil ha, na safra 2020/2021, havendo uma produtividade de 1.106 quilos por hectare, correspondendo à produção a cerca de 3,28 milhões de toneladas (CONAB 2021).

No entanto, diversos fatores podem interferir nessa produção, entre estes, o aparecimento de doenças que são uma das principais causas de sua baixa produtividade no Brasil, podendo causar a morte da cultura, redução significativa da produtividade e até inviabilizar áreas para o cultivo. Tais doenças são causadas por patógenos como vírus, fungos, bactérias e nematoides (WENDLAND et al., 2016).

A soja (*Glycine max* L.) é uma das leguminosas mais produzidas no Brasil e no mundo, sendo considerada uma das culturas agrícolas que mais cresceu nas últimas três décadas, com uma área de cultivo relevante correspondendo a mais de 50% de toda área cultivada com grãos no Brasil (ZAMBIAZZI et al., 2017) e, devido a sua rentabilidade e seu potencial econômico para a comercialização no mercado nacional e internacional, é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil, sendo a commodity que mais se destaca em território brasileiro e uma das principais culturas do agronegócio (VINHAL-FREITAS et al., 2011; FRARE, 2020). Porém, dezenas de doenças tem sido identificadas em soja, o que pode comprometer a sua produção (GODOY et al., 2016).

Para se defender do ataque de um patógeno, a planta pode utilizar diversos mecanismos de defesa ou de resistência (STANGARLIN et al., 2011). A resistência de um hospedeiro ao ataque de microrganismos causadores de doenças pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Os mecanismos de defesa podem ser estruturais ou bioquímicos. Os mecanismos estruturais são as barreiras físicas da planta, que atuam impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto os bioquímicos englobam as substâncias capazes de inibir a ação do patógeno na planta (STANGARLIN et al., 2011).

Entre os mecanismos bioquímicos de defesa vegetal estão as fitoalexinas, que são compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, que são produzidas pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos, acumulando-se nas células vegetais e sendo capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos (BRAGA, 2001).

Na cultura do feijoeiro, a fitoalexina mais importante na interação patógeno-planta no é a faseolina, que foi primeiramente detectada por Müller (1958) e, desde então, estudos têm sido conduzidos comprovando sua ação no controle de patógenos (BRAND et al., 2010). Já na cultura da soja, a fitoalexina gliceolina (pterocarpanóide) mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos, sendo que a utilização de cotilédones de soja mostrou-se



como excelente ferramenta para estudos envolvendo ação elicitora de moléculas de origem biótica e abiótica (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

O alecrim, pertencente à família Limiaceae, é um arbusto perene, nativo do Mediterrâneo (MAY et al., 2010). O extrato de alecrim, *Rosmarinus officinalis* identificador e família tem sido utilizado em diversas pesquisas para controle de doenças de plantas, atuando como indutores de resistência contra patógenos e, enriquecido com o cálcio da alga *Lithothamnium* terá seu potencial bioativo melhorado (MÜLLER et al., 2016; LORENZETTI et al., 2017; LORENZETTI et al., 2018; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). O potencial de alecrim para o controle de patógenos tem sido verificado em diversos patossistemas, como *Cladosporium fulvum* em tomateiro (ITAKO et al., 2009), *Pseudocercospora vitis* e *Plasmopara viticola* em videira (MAIA et al., 2014) e *Macrophomina phaseolina* em soja (LORENZETTI et al., 2016).

O cálcio é um importante elemento envolvido na resistência das plantas contra fitopatógenos, em função do seu papel como fortalecedor de parede celular e lamela média vegetal (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

No caso do *Lithothamnium* (esqueleto de alga calcária), através de pesquisas a respeito de seu uso, verificou-se que até o momento, não há nenhum relato sobre a utilização do mesmo como ativador de mecanismos de defesa vegetal em plantas.

Assim, estudo da síntese de fitoalexinas, abre enormes perspectivas para a descoberta de novos produtos naturais com atividade antimicrobiana e cujas estruturas podem servir como modelo para a síntese química de defensivos agrícolas naturais (BRAGA, 2001).

Dessa forma, a condução deste trabalho preliminar, dará indicações para que o mesmo possa ser utilizado em ensaios futuros de indução de resistência em feijão e soja para controle de doenças. Diante disso, o trabalho objetivou verificar o potencial do formulado de alecrim + *Lithothamnium* na indução de mecanismos de defesa da soja e feijão.

Material e métodos

Os trabalhos foram realizados nos Laboratórios de Nematologia e de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus de Marechal Cândido Rondon.

Para o ensaio de produção da fitoalexina faseolina, sementes de feijão da variedade Carioca foram desinfestadas superficialmente em etanol 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio (1 parte de hipoclorito para 3 partes de água destilada) por 3 minutos e lavadas em água destilada. Assim, após a desinfestação, as sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo areia esterilizada em autoclave a 120 °C e 1 atm no período de 1 h. As bandejas foram cobertas com papel alumínio e mantidas a 25 °C por sete dias até que os hipocótilos estiolassem. Estes foram cortados com bisturi em segmentos de 5 cm, e lavados em água destilada para retirada de impurezas. Após, foram mantidos sobre papel absorvente por 10 minutos, para retirada do excesso de água. Em tubos de ensaio, foram transferidos quatro segmentos de hipocótilo, de modo que cada um recebeu 1 mL do tratamento.

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizados, com cinco repetições. Os respectivos tratamentos foram: 0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹ do formulado alecrim + *Lithothamnium* (produto comercial adquirido), preparadas pela dissolução do produto em água destilada.



Depois de 48 h em escuro, os hipocótilos de cada tratamento foram pesados e transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL de etanol 98% e mantidos a 4 °C por 48 h para extração da fitoalexina formada. Posteriormente, o teor de faseolina produzida foi mensurado em espectrofotômetro a 280 nm. Os valores foram expressos em absorbância por grama de massa fresca ($\text{ABS } \mu\text{g}^{-1}$) (BAILEY; BURDEN, 1983).

Para os tratamentos eliciadores da síntese da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, o formulado alecrim + *Lithothamnium* foi utilizado nas mesmas concentrações do feijão, a partir de produto desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Controle Biológico e Alternativo em Fitossanidade (COBALFI-Unioeste). Como tratamento testemunha, foi utilizada água destilada.

O delineamento empregado bem como o número de repetições foram os mesmos descritos anteriormente.

Sementes de soja foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos e em hipoclorito de sódio (3 partes de hipoclorito para 1 parte de água) por 1 minuto, sendo então lavadas em água destilada e semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo areia esterilizada em autoclave (120 °C e 1 atm durante 1 h). As bandejas foram colocadas em câmara de crescimento (25 °C e fotoperíodo de 12 h com luminosidade de lâmpadas LED; 274 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 10 dias.

Os cotilédones foram então destacados e colocados em placas de petri (seis cotilédones/placa) contendo três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas em água destilada esterilizada. Em cada cotilédone foi feita uma “cunha” na superfície adaxial, com o auxílio de um estilete e, em cada uma destas, foram adicionados 20 μL dos tratamentos.

As placas ficaram incubadas em BOD à 25 °C, no escuro, por 20 h. Após esse período, os cotilédones foram transferidos para tubos de ensaio com 15 mL de água destilada esterilizada e esses foram agitados em agitador orbital (150 rpm) durante 1 h, para extração da fitoalexina gliceolina.

Em seguida, os cotilédones foram retirados e o sobrenadante teve sua absorbância lida em espectrofotômetro a 285 nm. Como testemunha negativa foi utilizada água destilada esterilizada (BAILEY; BURDEN, 1983).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão, utilizando o programa estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011).

Resultados e discussão

O extrato a base de alecrim + *Lithothamnium* induziu a síntese da fitoalexina faseolina no feijoeiro, de maneira dose-dependente, representada por equação quadrática (Figura 1). As maiores concentrações de extrato de alecrim, favoreceram a produção da faseolina.

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, produzidos pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos (MAZARO et al., 2008). O acúmulo de fitoalexina na concentração zero (tratamento controle), possivelmente foi ocasionado pela injúria física decorrente da fragmentação do hipocótilo durante a montagem do experimento.

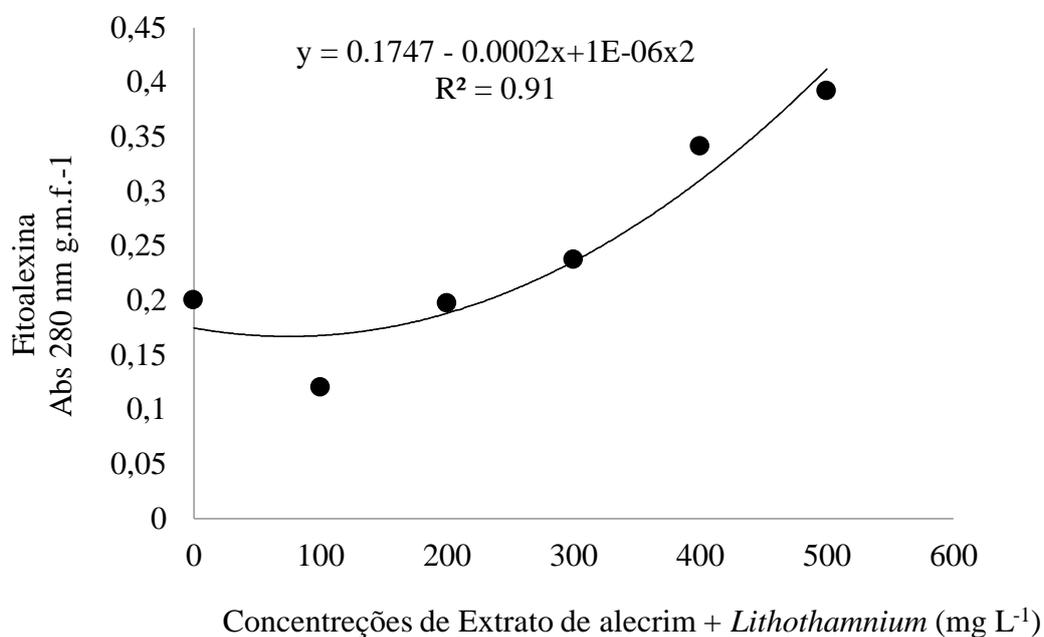
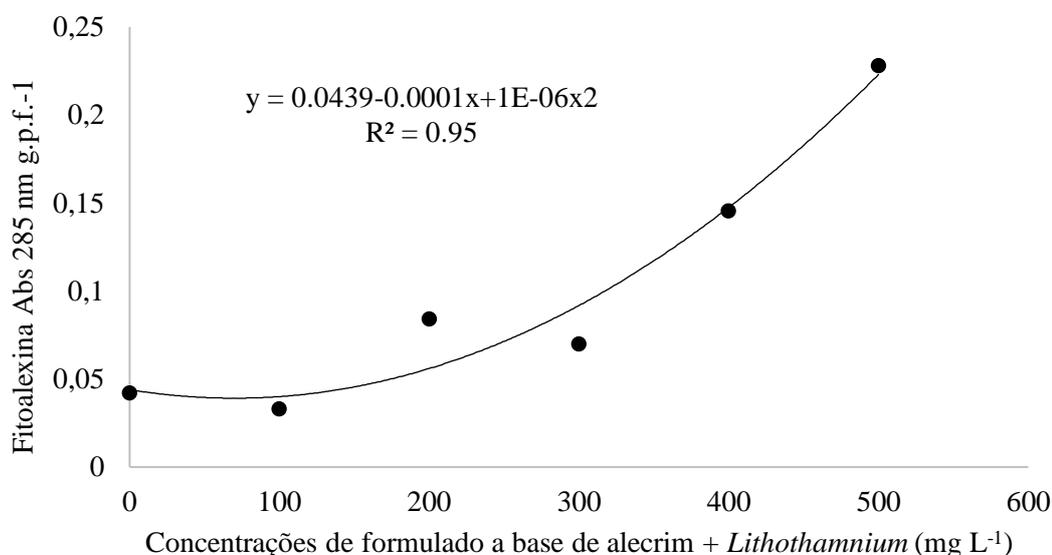


Figura 1. Indução da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro pelo formulado alecrim + *Lithothamnium*. CV = 27,87%.

O fato das demais concentrações terem induzido a síntese de faseolina de maneira significativa indica que este formulado a base de alecrim + *Lithothamnium* pode ser uma alternativa para ensaios futuros de controle de doenças em plantas através do mecanismo de indução de resistência vegetal a fitopatógenos.

De acordo com a Figura 2, o formulado a base de alecrim + *Lithothamnium* obteve potencial para indução da fitoalexina gliceolina na soja. Esse efeito indutor foi dose-dependente representado por equação quadrática. A medida que as concentrações do formulado foi aumentando, houve efeito de maior indução, sendo a dose máxima trabalhada (500 mg L⁻¹) a que obteve-se maior produção de fitoalexina. Esse resultado indica o potencial do extrato na indução desse importante mecanismo de defesa em plantas.



Fonte: Elaborado pelos autores

Figura 2. Produção da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja tratada com concentrações do formulado alecrim (*Rosmarinus officinalis*) + *Lithothamnium*. CV = 36%.

Esses resultados são corroborados pela afirmação de Diana et al. (2014) que diz que diversos extratos naturais, como derivados de plantas e microrganismos, têm mostrado potencial para o controle alternativo de doenças em plantas, ou por sua atividade direta sobre o fitopatógeno ou pela indução de resistência.

Mazaro et al. (2008) obteve resultados semelhantes ao avaliar o potencial de diferentes preparados de pitangueira para a ativação dos mecanismos de defesa vegetal por meio da produção de fitoalexinas em soja, também de maneira dose-dependente. Ademais, foi avaliado por Gouvea et al. (2011) o efeito da aplicação de extrato de alho na produção de fitoalexinas em soja e obtiveram resultados significativos.

Conclusão

O formulado a base de alecrim + *Lithothamnium* apresenta efeito potencial de indução de fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijão e de fitoalexina gliceolina em soja de maneira dose-dependente.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e a Unioeste pela infraestrutura disponível para realização do trabalho.



Conflitos de interesse

Os autores desse manuscrito não declaram conflito de interesse.

Referências

- 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. 2, p. 171-177, 1983.
- BRAGA, M. R. Fitoalexinas e a defesa das plantas. 2001. Disponível em: <http://www.sbgq.org.br/PN-NET/texto5/defesa.htm>. Acesso em 2006.
- BRAND, S.C; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; MILANESI, P.M; SCHEREN, M.B; ANTONELLO, L.M. 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.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Mercado de Feijão, Safra 2020/2021. Disponível em: < https://www.conab.gov.br/info_dasafradegraos >. Acesso em 2021.
- DIANA, B.; SCARIOT, E.; TELAXKA, F.J; JASKI, J.M; FRANZENER, G.; MOURA, G.S; GROSSELLI, M.A. Indução de faseolina em feijão e na atividade antibacteriana sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli pelo extrato etanólico de própolis. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n.1, p. 1-5, 2014.
- FRARE, T. T. **Desempenho de cultivares de soja (*Glycine max*) tratadas com fungicida isolado e combinado à inseticida e fertilizante**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) –Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2021.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GODOY, C.V.; ALMEIDA, A.M.R.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C.; DIAS, W.P.; SEIXAS, C.D.S.; SOARES, R.M.; HENNING, A.A.; YORINORI, J.T.; FERREIRA, L.P.; SILVA, J.F.V. Doenças da soja. In: AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Ouro Fino: Agronômica Ceres, p. 657-675, 2016.
- GOUVEA, A.; ZANOTTI, J.; LUCKMANN, D.; PIZZATTO, M.; MAZARO, S.M.; POSSENTI, J.C. Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e campo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 70-78, 2011.
- ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TOLENTINO JR, J.B.; CRUZ, M.E.S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 76, n. 1, p. 75-83, 2009.



- LORENZETTI, E.; HOEPERS, L.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J. Controle de podridão cinzenta da haste em soja por extrato de alecrim. **Engenharia e Agronomia**. V. 4, n. 1, p. 1-5, 2016.
- LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; PORTZ, R.L. Indução de resistência *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n.1, p. 45-50, 2018.
- LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J. Antifungal activity of rosemary extract on *Macrophomina phaseolina* and charcoal rot control in soybean. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 3, p. 777-780, 2017.
- MAIA, A.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FARIA, C.M.D.R.; OLIVEIRA, J.S.B.; JARDINETTI, V.A.; BATISTI, B.N. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 330-339, 2014.
- MELO FILHO, L.C de. Adubação Foliar com Molibdênio no Feijoeiro em Rondônia. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) -Universidade Federal de Rondônia, Mato Grosso, 2008.
- MAY, A.; SUGINO, E.; MARTINS, A.N.; BARATA, L.E.S.; PINHEIRO, M.Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 195-200, 2010.
- MAZARO, S.M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S.S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1-7, 2008.
- MÜLLER, K.O. The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infection with *Sclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 275-300, 1958.
- MÜLLER, M.A.; MIORANZA, T.M.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; BATTISTUS, A.G.; ISTCHUK, A.N.; FUCHS, F. In vitro toxicity and control of *Meloidogyne incognita* in soybean by rosemary extract. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 37, n. 1, p. 103-110, 2016.
- PASCHOLATI, S.F.; DALIO, R.J.D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. Ouro Fino: Agronômica Ceres, p. 423-452, 2018.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**. v. 30, n. ½, p. 129-137, 2000.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência contra fitopatógenos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 125-138, 2005.



STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V./; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

WENDLAN, A.; MOREIRA, A.S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN, J.S.; LOBO JÚNIOR, M. Doenças do feijoeiro. In: AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Ouro Fino: Agronômica Ceres, p. 383-396, 2016.

VINHAL-FREITAS, I. C.; JUNIOR, J. E. G.; SEGUNDO, J. P.; VILARINHO, M. S. Germinação e vigor de sementes de soja classificadas em diferentes tamanhos. **Agropecuária técnica**, v. 32, n. 1, p. 108-114, 2011.

ZAMBIAZZI, E. V.; BRUZI, A. T.; ZUFFO, A. M.; SOARES, I. O.; MENDES, A. E. S.; TERESANI, A. L. R.; GWINNER, R.; CARVALHO, J. P. S.; MOREIRA, S. G. Desempenho agrônomico e qualidade sanitária de sementes de soja em resposta à adubação potássica. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 3, p. 543-553. 2017.