

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON

SAMARA BRANDÃO QUEIROZ

BIOMETAIS COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA NO FEIJOEIRO SOBRE
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* E *Colletotrichum lindemuthianum*

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2019

SAMARA BRANDÃO QUEIROZ

**BIOMETAIS COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA NO FEIJOEIRO SOBRE
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* E *Colletotrichum lindemuthianum***

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Orientador: Prof. Dr. José Barbosa Duarte Júnior.

Coorientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Queiroz, Samara Brandão

Biometais como indutor de resistência no feijoeiro sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Colletotrichum lindemuthianum* / Samara Brandão Queiroz; orientador(a), José Barbosa Duarte Júnior; coorientador(a), José Renato Stangarlin, 2019.

90 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Agronomia Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Indução de resistência. 3. Fitopatologia. 4. Fitotecnia. I. Barbosa Duarte Júnior, José. II. Stangarlin, José Renato. III. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.

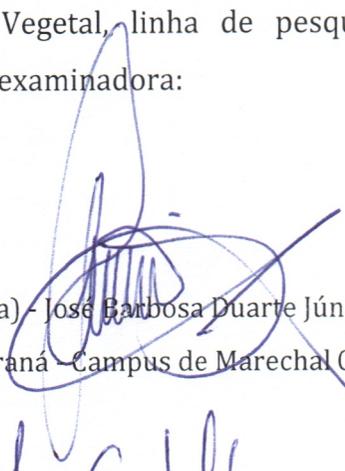


PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

SAMARA BRANDÃO QUEIROZ

Biometais como indutor de resistência no feijoeiro sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Colletotrichum lindemuthianum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Manejo de Culturas, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientador(a) - José Barbosa Duarte Júnior

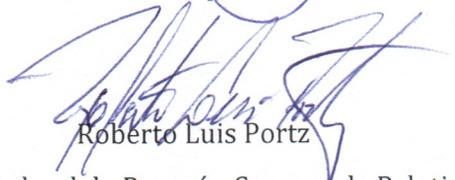
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


Antonio Carlos Torres da Costa

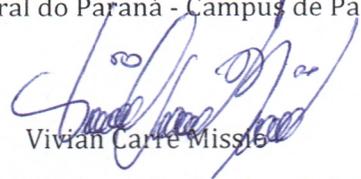
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


José Renato Stangarlin

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


Roberto Luis Portz

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)


Vivian Carré Missio

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Marechal Cândido Rondon, 27 de fevereiro de 2019

**A Deus, porque dEle, por Ele
e para Ele são todas as coisas!
Ao meu esposo Thiago e a minha família.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, o autor e consumidor de toda a existência, o único capaz de operar tanto o querer quanto o efetuar em nossas vidas, toda honra, glória e sabedoria para sempre!

A meu esposo, que esteve ao meu lado desde o início, que auxiliou nos experimentos, me incentivou nos momentos de desânimo, foi compreensivo em períodos de privação, foi auxiliador e amigo, amado companheiro.

A meus pais, Dejamir e Jussara, aos meus irmãos Aline e Fabrício, pelos ensinamentos repassados, incentivo, palavras de conforto, compreensão, orações e muito amor, nos momentos críticos.

A meu orientador, Dr. José Barbosa Duarte Júnior, pelos conhecimentos repassados, pela atenção, paciência, disposição e orientação, que foram primordiais no desenvolvimento dessa obra, pelas palavras sabedoria, direções e mentoria valiosas, meu muito obrigada.

Aos professores Dr. Antônio Carlos Torres da Costa, José Renato Stangarlin, Odair José Kuhn, pela coorientação, pela disposição do tempo, pelos ensinamentos transmitidos e palavras motivadoras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), ao Curso de Agronomia, aos professores, aos funcionários do Núcleo de Estações Experimentais (NEE) e a toda a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), que oportunizou a realização deste trabalho, as pessoas que contribuíram direta e indiretamente no desenvolvimento dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos.

A Empresa Núcleo de Pesquisas Avançadas (NPA), pelo fornecimento dos produtos que embasaram esse estudo, e em especial a Cinthia Röder, pelo auxílio na pesquisa, disposição e colaboração do início ao fim, muito obrigada.

Aos amigos do grupo Grupo de Pesquisa e Estudos Avançados em Fitotecnia (GEPAF), Willian Bosquette Rosa, pela amizade, ajuda, dedicação e companheirismo, ao Ivonei, Luanna, Guilherme, Bruno, Letícia e Patrícia pelo auxílio, experiências e trocas de informações. Também ao Grupo de Controle Biológico e Alternativo em Fitossanidade (COBALFI), aos amigos Nicanor, Jeferson,

Eloisa, Anderson e Eliana, pelos ensinamentos repassados, experiências, auxílios práticos, conversas edificantes e confortantes, vocês foram essenciais.

A todos que contribuíram, se disporem, incentivaram, ajudaram, direcionaram no desenvolvimento dessa obra, a participação e o trabalho em conjunto faz que com a caminhada seja mais proveitosa e agradável, meu muitíssimo obrigada a vocês!

Feliz o homem que acha a sabedoria, e a pessoa que encontra o entendimento, pois a sabedoria é muito mais proveitosa que a prata, e o lucro que ela proporciona é maior que o acúmulo de ouro fino.

Provérbios 3: 13-14

BIOGRAFIA

Samara Brandão Queiroz, filha de Dejamir Brandão de Queiroz e Jussara Nacira Pratis de Queiroz, nasceu no município de Ji-Paraná - RO, em 08 de abril de 1991. Durante a infância viveu no sítio Queiroz, localizado na zona rural de Londrina – PR, onde realizava atividades na agricultura familiar, juntamente com seus pais, como: horticultura, semeadura de grandes culturas, como soja, milho e trigo, e em funções de manejo na avicultura e bovinocultura.

Em fevereiro de 2009 ingressou no curso Bacharel em Agronomia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon. No ano de 2010, instaurou-se na pesquisa como aluna bolsista de Iniciação Científica (Capes/Cnpq), desenvolvendo trabalhos na área Controle Biológico de Pragas, até o ano de 2013, apresentando seu Trabalho de Conclusão de Curso, denominado: “Uso de manipueira no controle de *Dysmicoccus* sp. (Hemiptera: Pseudococcidae)”.

Em Março de 2014, ingressou no Mestrado em Produção Vegetal na linha de pesquisa – Manejo de Grandes Culturas, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, como aluna bolsista pela instituição CAPES/Fundação Araucária. Desenvolvendo uma pesquisa dissertativa intitulada como “Atividade inseticida de produtos químicos e alternativas sobre insetos-pragas da cultura do feijoeiro comum”.

No ano de 2015, iniciou atividades docentes e lecionou no curso Técnico em Meio Ambiente e posteriormente no curso Técnico em Agropecuária, nas disciplinas de Química Ambiental e Produção Vegetal, respectivamente, na Secretaria de Educação do Estado do Paraná.

Em 2016 iniciou o Aperfeiçoamento em Licenciatura Plena em Agronomia, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* de Medianeira, finalizando-o em setembro do ano de 2017, com o Trabalho de Conclusão do Curso, nomeado de “Implementação de hortas orgânicas no ensino profissionalizante: Uma iniciativa socioambiental”.

Em Março de 2016 ingressou no curso de Doutorado em Produção Vegetal através do Programa de Pós-graduação em Agronomia, atuando nas linhas de pesquisa de Grandes Culturas e Controle Alternativo. Participou como membro do Grupo de Pesquisas e Estudos Avançados em Fitotecnia – GEPAF e do Grupo de

Pesquisa em Controle Biológico e Alternativo em Fitossanidade – COBALFI, da
Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

RESUMO

QUEIROZ, Samara Brandão, M. S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Fevereiro – 2019. **Biometais como indutor de resistência no feijoeiro sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Colletotrichum lindemuthianum*.** Orientador: Prof. Dr. José Barbosa Duarte Júnior. Coorientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin.

Entre os entraves de produção, as doenças evidenciam potencial limitador, especialmente por onerar custos de controle e riscos ambientais. Objetivou-se avaliar o efeito indutor de resistência de quelatos metais-aminoácidos no controle do cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e da antracnose do feijoeiro (*Colletotrichum lindemuthianum*). As experimentações foram efetuadas de três formas: *in vitro*, em cultivo protegido e a campo, em dois locais (Marechal Cândido Rondon e Toledo - PR). Na condição *in vitro*, foram avaliados o efeito fungitóxico dos quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn sobre conídios de *C. lindemuthianum*, e bactericida em células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Ambos experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 x 5) (quatro produtos acima descritos nas concentrações 0, 0,25; 0,5; 0,75 e 1% (v/v)), com cinco repetições. Em cultivo protegido e a campo, os experimentos foram realizados em blocos casualizados, com os quelatos metais-aminoácidos descritos mais a testemunha (água) e quatro repetições. Os resultados das diferentes concentrações foram submetidos à análise de variância e de regressão, os dados de campo foram submetidos a uma análise conjunta, e para as avaliações de severidade aplicou a fórmula da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os resultados *in vitro* evidenciaram influência dos produtos sobre a germinação dos conídios de *C. lindemuthianum*, superior a 90% de controle, e para *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, o tratamento Zn apresentou efeito bactericida, reduzindo a porcentagem de colônias formadas em 67%. Para as avaliações do cretamento bacteriano comum, observou-se em cultivo protegido a menor AACPD com os quelatos metais-aminoácidos de Ca e Zn, enquanto que as atividades enzimáticas, apresentaram picos de atividade após a pulverização dos produtos, com posterior queda pós inoculação da bactéria, e, nos ensaios de campo observou-se incremento na variável número de vagem por planta com o tratamento Cu. Os testes com *C. lindemuthianum* revelaram a menor AACPD através do tratamento Cu. As atividades enzimáticas foram ativadas após o

fornecimento do tratamento de Ca para fenilalanina amônia-liase e de Mn para polifenoloxidase e β -1,3 glucanase, decaindo após a inoculação do patógeno. O município de Toledo-PR mostrou-se menos favorável ao desenvolvimento do *C. lindemuthianum*, os quelatos metais-aminoácidos não influenciaram nas médias de AACPD, nem nas variáveis agronômicas. Diante dos efeitos antimicrobianos *in vitro*, da diminuição da AACPD das doenças, ativação enzimática após o fornecimento dos produtos, seguido da diminuição pós inoculação e incremento no número de vagens por planta, conclui-se que os quelatos metais-aminoácidos testados possuem potencial como indutores de resistência a *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *C. lindemuthianum* em feijoeiro.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Quelatos metais-aminoácidos. Doenças do feijoeiro. Enzimas de defesa. Variáveis agronômicas.

ABSTRACT

QUEIROZ, Samara Brandão, M. S., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February – 2019. **Biometals as an inducer of resistance in common bean on *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Colletotrichum lindemuthianum*.** Advisor: Prof. PhD. José Barbosa Duarte Júnior. Co-Advisor: Prof. PhD. José Renato Stangarlin.

Among the factors that effect the productivity, the plant diseases show a limiting potential, especially due the cost of control and environmental risks. The objective of this study was to evaluate the resistance-inducing effect of metal-aminoacid chelates on control of common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) and anthracnose of common bean (*Colletotrichum lindemuthianum*). The experiments were carried out *in vitro*, in greenhouse and in the field, in two places (Marechal Cândido Rondon and Toledo - PR). *In vitro* condition, the fungitoxic effect of the metal-aminoacid chelates of Cu, Mn, Ca and Zn on spores of *C. lindemuthianum* and bactericide on *X. axonopodis* pv. *phaseoli* were evaluated. Both experiments were carried out in a completely randomized design, in factorial scheme (4x5) (four products in concentrations 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1% (v/v)), with five replicates. In greenhouse and in the field, the experiments were performed in randomized blocks, with the metal-aminoacid chelates described plus the control (water) and four replicates. The results of different concentrations were submitted to analysis of variance and of regression test, the field data were submitted to a joint analysis, and for the severity evaluations applied the formula of the area under the disease progress curve (AUDPC). *In vitro* results evidenced the influence of the products on the spores germination of *C. lindemuthianum*, superior to 90% of control, and for *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, the Zn treatment presented bactericidal effect, reducing the percentage of formed colonies in 67%. For the evaluations of common bacterial blight, the lowest ABDPC with the metal-aminoacid chelates of Ca and Zn were observed in protected culture, and the enzymatic activities showed peaks of activity after the spraying of the products, with subsequent drop after inoculation of the bacterium, and in the field trials an increase in the number of pods per plant was observed with the Cu treatment. Tests with *C. lindemuthianum* revealed the lowest AUDPC through the Cu treatment, and enzymatic activities were activated after the supply of Ca treatment to phenylalanine ammonia-lyase, Mn to polyphenoloxidase

and β -1,3 glucanase, reducing after inoculation of pathogen. The municipality of Toledo-PR was less favorable to the development of *C. lindemuthianum*, metal-aminoacid chelates did not influence the AUDPC means, nor in the agronomic variables. Considering the *in vitro* antimicrobial effects, the decrease of AUDPC for both diseases, enzymatic activation after the products supply, followed by the decrease after inoculation, and the increase in the number of pods per plant, it was concluded that the chelates tested have potential as inductors of resistance to *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and *C. lindemuthianum* in common bean.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Metal-aminoacid chelates. Bean diseases. Enzymes of defense. Agronomic variables.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1: AÇÃO *IN VITRO* DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS SOBRE *Colletotrichum lindemuthianum* E *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Figura 1. Porcentagem de conídios não germinados de *Colletotrichum lindemuthianum* sob produtos quelatos metais-aminoácidos de Cu (A), Mn (B), Ca (C) e Zn (D), nas concentrações 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%, *in vitro*..... 14

Figura 2. Número de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* sob produtos quelatos metais-aminoácidos de Cu (A), Mn (B), Ca (C) e Zn (D), nas concentrações 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%, *in vitro*..... 16

ARTIGO 2: EFEITO DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO FEIJOEIRO A *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Figura 1. Precipitação (mm), temperatura mínima (tMin), média (tMéd) e máxima (tMax) (°C) dos municípios de Marechal Cândido Rondon (MCR) e Toledo (TOO) – Pr, nos meses de Agosto a Dezembro, período em que realizaram-se dois experimentos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) cultivados em 1ª safra. UNIOESTE, 2017.....29

Figura 2. Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD) para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, em função da aplicação dos quelatos metais-aminoácidos de Ca, Cu, Mn e Zn, mais a testemunha. A aplicação dos produtos ocorreu no estágio fenológico V₃, 24 dias após a emergência, e as avaliações realizadas com intervalo de 72 horas. a comparação entre as médias de AACPD se deu pelo teste de Tukey com P < 0,05. Coeficiente de variação de 18,58%. Unioeste, 2018.....33

Figura 3. Atividade da fenilalanina amônia-liase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (na concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P <0,05. N.S.: não significativo.....34

Figura 4. Atividade da polifenoloxidase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação dos produtos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca, Zn e a testemunha (água). A inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (na concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹) ocorreu 72 horas após tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P <0,05. N.S.: não significativo.....34

Figura 5. Atividade da peroxidase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca, Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (na concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹) ocorreu 72 horas após tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P <0,05. N.S.: não significativo.35

Figura 6. Atividade da β-1,3 glucanase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca, Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (na concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹) ocorreu 72 horas após patógenos tratamentos.....35

Figura 7. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) a campo, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* no município de Marechal Cândido Rondon - PR e Toledo - PR, em função da aplicação dos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn, mais a testemunha. As aplicações dos produtos foram efetuadas nos estádios fenológicos V₃ e R₅, sendo as avaliações realizadas com intervalo de cinco dias. A comparação entre as médias de AACPD se deu pelo teste de Tukey com P < 0,05. Coeficiente de variação de 25,39%. UNIOESTE, 2017.....38

ARTIGO 3: USO DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO A *Colletotrichum lindemuthianum*

Figura 1. Precipitação (mm), temperatura mínima (tMin), média (tMéd) e máxima (tMax) (°C) dos municípios de Marechal Cândido Rondon (MCR) e Toledo (TOO) – Pr, nos meses de Agosto a Dezembro, período em que realizaram-se dois experimentos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) cultivados em 1^a safra. UNIOESTE, 2018.....55

Figura 2. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para a antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, em função da aplicação dos quelatos metais-aminoácidos de cobre (Cu), cálcio (Ca), manganês (Mn) e zinco (Zn), mais a testemunha. A aplicação dos produtos ocorreu no estágio fenológico V₃, 24 dias após a emergência, e as avaliações realizadas com intervalo de 72 horas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P < 0,05, Coeficiente de variação de 35,91%. UNIOESTE, 2017.....58

Figura 3. Atividade de fenilalanina amônia-liase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados aminoácidos metais de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação do fungo *C. lindemuthianum* (na concentração de 2,25 x 10⁶ esporos mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P < 0,05. N.S.: não significativo.....60

Figura 4. Atividade de polifenoloxidase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados aminoácidos metais de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação do fungo *C. lindemuthianum* (na concentração de 2,25 x 10⁶ esporos mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P < 0,05. N.S.: não significativo.....61

Figura 5. Atividade de peroxidase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados aminoácidos metais de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação do fungo *C. lindemuthianum* (na concentração de 2,25 x 10⁶ esporos mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P < 0,05. N.S.: não significativo.....62

Figura 6. Atividade de β-1,3 glucanase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados aminoácidos metais de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação do fungo *C. lindemuthianum* (na concentração de 2,25 x 10⁶ esporos mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P < 0,05. N.S.: não significativo.....63

Figura 7. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para a antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) 1^a safra, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* nos municípios de Marechal Cândido Rondon e Toledo - PR, em função da aplicação dos quelatos metais-aminoácidos de cobre (Cu), manganês (Mn), cálcio (Ca) e zinco (Zn) mais a testemunha. As aplicações dos produtos foram efetuadas nos estádios fenológicos V₃ e R₅, sendo as avaliações realizadas com intervalo de 5 dias. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P < 0,05, Coeficiente de variação de 47,55%. UNIOESTE, 2018.....64

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1: AÇÃO *IN VITRO* DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS SOBRE *Colletotrichum lindemuthianum* E *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Tabela 1. Número de conídios germinados de *Colletotrichum lindemuthianum in vitro*, após o fornecimento de quelatos metais-aminoácidos de cobre (Cu), manganês (Mn), cálcio (Ca) e zinco (Zn) nas concentrações 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1%.....12

Tabela 2. Médias de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* formadas *in vitro*, após o fornecimento de quelatos metais-aminoácidos de cobre (Cu), manganês (Mn), cálcio (Ca) e zinco (Zn) nas concentrações 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1%.....15

ARTIGO 2: EFEITO DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO FEIJOEIRO A *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Tabela 1. Resultados da análise química do solo para o experimento de feijão conduzido em cultivo protegido em Marechal Cândido Rondon-Pr. UNIOESTE, 2018.....25

Tabela 2. Resultado da análise química do solo para experimentos com feijão em dois locais na região Oeste do Paraná. UNIOESTE, 2018.....30

Tabela 3. Altura de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produtividade em função da aplicação de quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn, mais a testemunha, em dois locais de condução, na região Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon (MCR) e Toledo (TOO). 2018.....39

ARTIGO 3: USO DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO A *Colletotrichum lindemuthianum*

Tabela 1. Resultados da análise química do solo para o experimento de feijão conduzido em cultivo protegido em Marechal Cândido Rondon-Pr. UNIOESTE, 2017.....50

Tabela 2. Resultado da análise química do solo para experimentos com feijão em dois locais na região Oeste do Paraná. UNIOESTE, 2017.....55

Tabela 3. Altura de plantas (ALT), número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos (MCG) e produtividade (PRO) em função da aplicação de quelatos metais-aminoácido de cobre, manganês, cálcio e zinco, mais a testemunha, no município de Marechal Cândido Rondon Paraná. 2018.....65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
	REFERÊNCIAS	3
2	ARTIGO 1: AÇÃO <i>IN VITRO</i> DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS SOBRE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	6
2.1	INTRODUÇÃO.....	7
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	9
2.2.1	Ensaio Antimicrobiano com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	9
2.2.2	Ensaio Antimicrobiano com <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> ...	10
2.2.3	Análises Estatística.....	11
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
2.3.1	Ensaio Antimicrobiano com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	11
2.3.2	Ensaio Antimicrobiano com <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> ...	14
2.4	CONCLUSÕES.....	17
	REFERÊNCIAS	18
3	ARTIGO 2: EFEITO DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO FEIJOEIRO A <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	21
3.1	INTRODUÇÃO.....	22
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.2.1	Obtenção e manutenção da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	24
3.2.2	Avaliação em cultivo protegido	25
3.2.2.1	Análises Bioquímicas e Fisiológicas	26
3.2.2.1.1	Obtenção e armazenamento das amostras do tecido foliar	27
3.2.2.1.2	Atividade de peroxidase.....	27
3.2.2.1.3	Atividade de polifenoloxidase.....	27
3.2.2.1.4	Atividade de β -1,3 glucanase.....	28
3.2.2.1.5	Atividade de fenilalanina amônia-liase.....	28
3.2.2.2	Análises Estatística.....	29
3.2.3	Avaliações a Campo	29
3.2.3.1	Análises Agronômicas	32

3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.3.1	Cultivo Protegido.....	32
3.3.2	Resultados de Campo	37
3.4	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	41
4	ARTIGO 3: USO DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO FEJOEIRO A <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	46
4.1	INTRODUÇÃO.....	48
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.2.1	Obtenção e Manutenção do Inóculo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ..	49
4.2.2	Experimento em Cultivo Protegido.....	50
4.2.2.1	Obtenção e Armazenamento das Amostras do Tecido Foliar.....	52
4.2.2.2	Análises Bioquímicas e Fisiológicas	52
4.2.2.2.1	Atividade de peroxidases	52
4.2.2.2.2	Atividade de polifenoloxidase.....	53
4.2.2.2.3	Atividade de β -1,3- glucanase	53
4.2.2.2.4	Atividade de fenilalanina amônia-liase.....	53
4.2.2.3	Análises Estatística.....	54
4.2.3	Experimento de Campo	54
4.2.3.1	Análises Agronômicas	57
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.3.1	Cultivo Protegido.....	57
4.3.2	Resultados de Campo	63
4.4	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	71
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é culturalmente um consumidor inerente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), o que engloba a típica mistura culinária brasileira do arroz com feijão. Além de agradar o paladar, o feijão proporciona a seus consumidores uma composição bastante nutritiva composta de proteína bruta, fibras, carboidratos, fósforo, potássio, ferro, zinco e ácido fólico (ZILIO et al., 2017).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, (2018) classifica o sistema de semeadura do feijão em três épocas anuais: a primeira, é denominada safra das “águas”, devido os altos índices pluviométricos durante a semeadura e a colheita; a segunda safra é classificada como safra da “seca”, devido seu cultivo ser realizado no menor índice de chuva no país, já a terceira safra é conhecida no Sul do país como safra de “inverno” ou “irrigado”, devido a semeadura ocorrer em condições climáticas amenas e os produtores realizarem o uso da irrigação, respectivamente.

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, dados de 2018, a produção nacional total de feijão, englobando as três safras, foi de 3,17 milhões de toneladas, para a safra 18/19, sendo que o estado do Paraná obtém uma área de cultivo de 370,1 mil ha em uma média de produtividade de 1.622 kg ha⁻¹, destacando-se na posição de Estado maior produtor da leguminosa.

Apesar dessa expressiva produção, devida as mais variadas condições edafoclimáticas, a produtividade de feijoeiro muitas vezes se torna limitante devido a fatores abióticos como a adubação, luz e fotossíntese, bem como bióticos, destacando-se pragas, plantas daninhas e doenças (MONDO; NASCENTE, 2018).

Dentre as doenças que ocasionam perdas de produtividade, destacam-se o crestamento bacteriano comum, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e a antracnose, causada pelo patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo que ambas as doenças ocorrem de forma generalizada na planta, infectando quase que em sua totalidade (WENDLAND et al., 2016).

O crestamento bacteriano comum pode comprometer parte da produção das plantas de feijoeiro, além da sua transmissão ocorrer via semente, o que facilita sua disseminação para áreas livres do patógeno, dificultando a rastreabilidade, e conseqüentemente seu controle (RAVA; SARTORATO, 1994). Os sintomas são

visualizados em toda a parte aérea das plantas do feijão, notórias nas folhas, vagens e sementes, sendo identificadas a partir de lesões anasarcas, que tornam-se necróticas, margeadas por uma coloração amarelada, ocorrendo sob altas temperaturas e elevada umidade relativa (RAVA; SARTORATO, 1994; SILVA et al., 2008).

A antracnose é uma doença destaque no feijoeiro, seus sintomas são desenvolvidos a partir de temperaturas mais amenas, associadas a elevada umidade relativa (SARTORATO, 1987). Os danos ocasionados pelo fungo incluem a redução da produção fotossintética, sendo os sintomas visualizados nas folhas e nervuras em formas alongadas escuras, nos pecíolos e em caules, podendo apresentar cancrios; a depressão pode ser um fator sintomático nas vagens com um halo mais escuro saliente, circundado por uma borda marrom-acinzentada. Os danos dependendo do grau de infecção do patógeno, bem como das condições climáticas favoráveis, podem inviabilizar por completo a produção, ou ocorrendo 100% de perda (SUTTON, 1992; STEINHAUSER, 2016).

Medidas de controle preventivas, como a rotação de culturas, o uso de cultivares resistentes, eliminação de plantas daninhas e restos culturais, utilização de sementes saudáveis e vigorosas, além do uso de microrganismos antagonistas, são excelentes maneiras de evitar a entrada e/ou estabelecimento de patógenos na área de cultivo (SILVA et al., 2008; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2018).

Todavia, a forma de controle predominante nas lavouras brasileiras é com produtos químicos, os quais acarretam riscos ambientais, como a contaminação da água, solo, animais e alimentos; bem como a intoxicação dos aplicadores (desconhecimento do manuseio), e a resistência de patógenos (desequilíbrios biológicos), tornando essa prática arriscada e periculosa (TAKANO et al., 2015). Em contrapartida, estão sendo estudados produtos de menor toxicidade como extratos vegetais, biológicos e fertilizantes foliares, os quais possuem princípios ativos antimicrobianos, atuando como indutores de resistência de plantas a doenças (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005; STANGARLIN et al., 2008; FONSECA et al., 2015).

O emprego desses indutores de resistência bióticos, abióticos, físicos ou químicos, são tecnologias emergentes na pesquisa e mercado agrícola, tendo muito a percorrer no controle de doenças (NOZAKI; KLIEMANN, 2016). A indução de

resistência consiste em ativar a defesa da planta através de aspectos fisiológicos, é considerada uma forma de controle eficaz, uma vez que a planta consegue retardar, ou até mesmo impedir a entrada ou posterior estabelecimento do patógeno nos tecidos vegetal (PASCHOLATI; DALIO, 2018; STANGARLIN et al., 2011).

Os biometais são cem por cento quelatados, os complexos que fazem parte dessa composição são preparados a partir de aminoácidos naturais, possuindo as mesmas estruturas químicas e substâncias das moléculas sintetizadas naturalmente pelas plantas. Dessa maneira, os biometais funcionam de forma rápida na absorção, translocação e metabolização nas plantas, e, além da suplementação dos aminoácidos prontos que são consumidos pelos vegetais, podem contribuir para as respostas de defesa vegetal (MOHAMMADI; KHOSHGOFTARMANESH, 2014).

Desta maneira, o entendimento relacionado a indução de resistência das plantas de feijão aos patógenos citados com o uso de produtos biometais, pôde ampliar os conhecimentos relacionados a cultura e aos produtos quelatos metais-aminoácidos, que até então, são inovadores e portanto desconhecidos seus efeitos antimicrobianos.

A exposição dos patógenos *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *C. lindemuthianum*, bem como das plantas de feijoeiro aos quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn, influenciam no desenvolvimento e na indução de resistência, respectivamente.

Ante do exposto, este trabalho avaliou os possíveis mecanismos de defesa do feijoeiro aos patógenos *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *C. lindemuthianum*, embasando as pesquisas relacionadas ao controle alternativo sustentável das doenças.

REFERÊNCIAS

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Princípios gerais de controle. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 5.ed. v. 1. Ouro Fino – MG: Editora, Agronômica Ceres, 2018. p. 217-223, 2018.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, V. 6 Safra 2018/19 - Segundo levantamento, Brasília, p.1-142, 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/doencas.htm>>. Acesso em: 12 de mar. 2018.

FONSECA, M. C. M.; LEHNER, M. S.; GONÇALVES, M. G.; PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, A. F.; BONFIM, F. P. G.; PRADO, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 45-50, 2015.

MOHAMMADI, P.; KHOSHGOFTARMANESH, A. H. The effectiveness of synthetic zinc (Zn)-amino chelates in supplying Zn and alleviating salt-induced damages on hydroponically grown lettuce. **Scientia Horticulturae**. v. 172, p. 117–123, 2014.

MONDO, V. H. V.; NASCENTE, A. S. Produtividade do feijão-comum afetado por população de plantas. **Agrarian**, v. 11, n. 39, p. 89-94, 2018.

NOZAKI, M. H.; KLIEMANN, O. A. Avaliação do uso de fosfito no controle da antracnose em feijoeiro comum. **Agrarian**, v. 9, n. 31, p. 19-25, 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. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v. 1, p. 423-450, 2018.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; TEIXEIRA, H.; LOBO JÚNIOR, M.; WENDLAND, A. Doenças do feijoeiro: estratégias integradas de manejo. In: CARNEIRO, J. E. S.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão do plantio a colheita**. 1.ed. Viçosa: Editora, UFV, 2014.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: RAVA, C. A.; SARTORATO, A. (Eds). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, 1994.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; YOKAYAMA, M. **Principais doenças e pragas do feijoeiro comum no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPMPF, 3.ed. 1987.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P. et al. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ. p. 125-132, 2005.

SILVA, E. G.; MOURA, A. B.; DEUNER, C. C.; FARIAS, D. S. Estudo de mecanismos de biocontrole do crestamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Ceres**, v. 55, n. 5, p. 377-383, 2008.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 16, p. 265-304, 2008.

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.

STEINHAUSER, N. D. S. **Potencial de variedades locais de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) Quanto à resistência à antracnose em condições de campo**. 2016. 34 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2016.

SUTTON, B. C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. **Colletotrichum – Biology, pathology and control**. C. A. B. International, Wallingford, p.1-16, 1992.

TAKANO, H. K.; BRAZ, G. B. P.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; RIOS, F. A.; GHENO, E. A.; BIFFE, D. F.; FRANCHINI, L. H. M. Redução da fitointoxicação por herbicidas aplicados no feijoeiro com a utilização de fungicidas. **Agrarian**, v. 8, n. 27, p. 12-22, 2015.

WENDLAND 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. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 383-395, 2016.

ZILIO, M.; SOUZA, C. A.; COELHO, C. M. M. Diversidade fenotípica de nutrientes e anti-nutriente em grãos de feijão cultivados em diferentes locais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 12, n. 4, p. 526-534, 2017.

2 ARTIGO 1: AÇÃO *IN VITRO* DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS SOBRE *Colletotrichum lindemuthianum* E *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

RESUMO

Colletotrichum lindemuthianum e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* são exemplos limitadores de produção no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). O controle é realizado quimicamente, através de produtos que visam inviabilizar o desenvolvimento desses microrganismos. Os minerais quelatados são rapidamente absorvidos, translocados e metabolizados em plantas, e, além da suplementação dos aminoácidos prontos, podem auxiliar na defesa da planta contra patógenos. Objetivou-se avaliar *in vitro* os efeitos fungitóxico e bactericida de produtos quelatos metais-aminoácidos de cobre, manganês, cálcio e zinco, sobre conídios de *C. lindemuthianum* e células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Os experimentos foram realizadas em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 4 x 5, com os tratamentos citados nas concentrações 0, 0,25; 0,5; 0,75 e 1% (v/v), com cinco repetições. Os quelatados metais-aminoácidos promoveram uma redução superior a 90% na germinação dos conídios de *C. lindemuthianum*, quando utilizado a concentração 0,25% dos produtos. Para as avaliações de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, o tratamento Zn apresentou o melhor efeito bactericida, a partir da concentração 0,50%, reduzindo o número de colônias formadas em 67%. Estes resultados demonstram o potencial dos quelatos metais-aminoácidos de cobre, manganês, cálcio e zinco no controle desses patógenos do feijoeiro.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, antracnose, cretamento bacteriano comum, biometais, controle alternativo.

ABSTRACT

Colletotrichum lindemuthianum and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* are limiting examples of production in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The control is performed chemically, through products that aim to prevent the development of these microorganisms. Chelated minerals are rapidly absorbed, translocated and metabolized in plants, and in addition to the ready aminoacid supplementation, which can act in the defense of the plant against pathogens. The objective of this study was

to evaluate the *in vitro* fungitoxic and bactericidal effects of metal-aminoacid chelates of copper, manganese, calcium and zinc on spores of *C. lindemuthianum* and cells of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. The experiments were carried out in a completely randomized design, in a factorial scheme 4 x 5, with the treatments mentioned at concentrations 0, 0.25; 0.5; 0.75 and 1% (v/v), with five replicates. The chelated metal-aminoacids promoted a reduction of more than 90% in the germination of *C. lindemuthianum* spores, when the 0.25% concentration of the products was used. For the evaluations of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, the Zn treatment presented the best bactericidal effect, from the 0.50% concentration, reducing the number of colonies formed in 67%. These results demonstrate the potential of the metal-aminoacid chelates of copper, manganese, calcium and zinc in the control of those pathogens common bean.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, anthracnose, common bacterial blight, biometals, alternative control.

2.1 INTRODUÇÃO

Nas lavouras de feijão, as doenças são um dos fatores que comprometem a produtividade, causando, dependendo das condições de ambiente, consideráveis reduções na produção, ou ainda, inviabilizando determinadas áreas para o plantio (PAULA JUNIOR et al., 2014).

A antracnose, ocasionada pelo agente patogênico *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma das doenças fúngicas de destaque relacionadas à cultura do feijoeiro, cuja importância se dá em função da infecção ocorrer em praticamente todas as estruturas da planta (WENDLAND et al., 2016).

O crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) é uma importante bacteriose de ocorrência ampla e generalizada nos cultivos nos cultivos de feijão, principalmente em climas quentes e úmidos, atingindo estruturas como caule, folhas, vagens e sementes, ocasionando reduções de até 70%, comprometendo assim a produtividade (WENDLAND et al., 2016).

É importante a adoção de métodos integrados de controle de doenças, como a utilização de sementes saudáveis, rotação de culturas, eliminação de restos culturais, a adoção de cultivares resistentes, além do fornecimento de condições ideais para a

máxima expressão das plantas, como fornecimento hídrico adequado e a adubação, prevenindo a doença (SILVA et al., 2008).

A aplicação de fungicidas imóveis a sistêmicos, constitui uma alternativa de controle, sendo que grande número desses produtos químicos tem se mostrado eficientes no controle de doenças de plantas, desde que aplicadas corretamente (NASCIMENTO et al., 2008; COSTA et al., 2017). Todavia, além da elevação dos custos de produção, existem riscos de contaminação dos aplicadores e ambiental, sem mencionar a resistência dos microrganismos (LOPES et al., 2015).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas no âmbito de produtos químicos de menor toxicidade, extratos vegetais, biológicos e fertilizantes foliares que contenham princípios promissores no controle de doenças, atuando como indutores de resistência de plantas a doenças (ZACARONI, 2008; ALVES; NUNES, 2016; RUFINO et al., 2018). O emprego desses indutores de resistência bióticos, abióticos, físicos ou químicos, são tecnologias emergentes na pesquisa e mercado agrícola, tendo muito a percorrer no controle de doenças (NOZAKI; KLIEMANN, 2016).

Os minerais quelatados ou biometais são compostas por um quelato verdadeiro, possuindo uma estrutura química definida, onde se tem um metal ligado a duas moléculas de aminoácido. Por isso, funcionam de forma rápida na absorção, translocação e metabolização nas plantas, e, além da suplementação dos aminoácidos prontos que são consumidos pelos vegetais, podem contribuir para as respostas de defesa vegetal (MOHAMMADI; KHOSHGOFTARMANESH, 2014).

A resistência ou susceptibilidade das plantas a doenças pode ser promovida pelo efeito da nutrição mineral, alterando estruturas anatômicas, como células epidérmicas e cutículas, parede celular, o grau de silicificação, suberização e lignificação, além de influir nas propriedades bioquímicas, como redução de compostos fenólicos e/ou compostos orgânicos (ZAMBOLIM; VENTURA, 1996).

O uso de elementos químicos no controle de agentes fitopatogênicos vem sendo uma alternativa bastante interessante, demonstrando ser uma alternativa eficiente na redução de doenças. A exemplo disso, Moraes et al. (2009), testando doses de silicato de cálcio e de sulfato de cobre, observaram que o aumento do fornecimento desses elementos, provocava o decréscimo nos teores de outros elementos e aumento no teor de Si, conseqüentemente, na redução da antracnose do feijoeiro. Lenz et al., (2011) testaram a influência do zinco e manganês aplicados

juntamente com fungicidas sobre a severidade de doenças, concluíram que ocorreram reduções na severidade de *Drechslera tritici-repentis* e *Septoria tritici*, devido à aplicação do epoxiconazol + piraclostrobina, associados aos micronutrientes Zn e Mn.

Os quelatos metais-aminoácidos influenciam negativamente nas relações patógeno-hospedeiro, desfavorecendo o desenvolvimento dos microrganismos *C. lindemuthianum* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Devida a ações antimicrobianas dos elementos quelatados, esse trabalho objetivou avaliar *in vitro* os efeitos fungitóxicos de quelatos metais-aminoácidos de cobre, manganês, cálcio e zinco, sobre conídios de *C. lindemuthianum*, bem como da atividade antibacteriana sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Ensaio Antimicrobiano com *Colletotrichum lindemuthianum*

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Fitopatologia e Nematologia da Universidade estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *Campus* de Marechal Cândido Rondon-PR.

O delineamento experimental utilizados para ambos ensaios antimicrobianos foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, em um esquema fatorial (4x5), sendo quatro biometais em cinco concentrações 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%.

Com relação aos tratamentos testados, a distribuição foi quelatos metais-aminoácidos de cobre, manganês, cálcio e zinco com as respectivas doses 59,5 g L⁻¹, 62,5 g L⁻¹, 59,5 g L⁻¹ e 130 g L⁻¹, seguindo a recomendação do fabricante, ajustadas nas concentrações citadas.

O patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* foi obtido de isolados da raça 73 de *C. lindemuthianum*, cedido pela EMBRAPA - CNPAF, Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO (CI 1247-78, CNPAF - Embrapa), o qual era mantido preservado em água destilada estéril (CASTELLANI, 1967), e multiplicado em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar. As placas foram incubadas em câmara BOD sob fotoperíodo de 12 horas, a 24 °C por 15 dias (DILDEY et al., 2014).

Para a obtenção dos conídios, foram retirados fragmentos do fungo já desenvolvidos nas placas e adicionados a tubos de ensaio contendo uma vagem de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) mais meio ágar-água 1%, previamente autoclavados. O período médio de incubação foi de 20 dias a 24 °C e fotoperíodo de 12 horas (TOILLIER et al., 2010), quando visualizava-se uma mucilagem alaranjada recobrando as vagens. Para a retirada dos conídios formados, foi adicionado 20 mL de água destilada em cada tubo de ensaio e feito um esfregaço sob a mucilagem formada, filtrando-se essa mistura em gaze e, na sequência, sendo feita a contagem em câmara de Neubauer seguindo a metodologia de Lucarini et al. (2004), ajustando a concentração.

Para o ensaio de atividade antifúngica *in vitro*, lâminas de microscopia foram revestidas com 1 mL de ágar-água 1% onde se adicionou 50 µL de suspensão de conídios de *C. lindemuthianum* (1×10^4 conídios mL⁻¹) obtidos de culturas com 20 dias de idade e 50 µL das soluções dos quelatos metais-aminoácidos, ajustadas para ter as concentrações descritas, anteriormente filtrados em membrana de nitrocelulose (0,45 µm de diâmetro de poro). Após 18 horas de incubação a 24 °C, paralisou-se a germinação com 50 µL de azul algodão com lactofenol em cada lâmina (VIECELLI et al., 2010).

Para a visualização e contabilização dos conídios, as lâminas foram observadas em microscópio de luz (aumento 40x), contando com o auxílio de um contador manual até atingir o número de cem, sendo considerados germinados os que apresentavam tubo germinativo desenvolvido, finalizando com o cálculo das percentagens (%) (POLTRONIERI et al., 2013).

2.2.2 Ensaio Antimicrobiano com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Com relação ao ensaio antibacteriano *in vitro*, semelhantemente ao antifúngico, foi desenvolvido nos laboratórios de Fitopatologia e Nematologia supracitados, bem como no delineamento experimental e tratamentos descrito anteriormente.

A experimentação foi prosseguida a partir de culturas estoque de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, preservadas em água destilada esterilizada, seguindo o método de Castellani, (1967). A bactéria foi plaqueada pelo método de

estrias em meio ágar-nutriente, com incubação a 28 °C por 48 horas (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Após essa etapa, obteve-se a curva de crescimento bacteriano, através das concentrações da suspensão, calculando-se os valores de unidades formadoras de colônias (UFCs), ajustadas para a leitura de absorbância de 0,004 em espectrofotômetro a 580 nm, que corresponde a 10^5 UFC mL⁻¹.

Em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-nutriente previamente esterilizado, adicionou-se 1 mL⁻¹ dos tratamentos quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn, anteriormente filtrados em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm de diâmetro de poro, nas mesmas doses e concentrações descritas no ensaio com *C. lindemuthianum*.

Após a completa absorção dos tratamentos no meio, adicionou-se 100 µL da suspensão bacteriana (10^5 UFC mL⁻¹), espalhando-os de forma homogênea com o auxílio da alça de Drigalski. A incubação se deu a 28 °C por 48 horas, realizando na sequência a contagem do número de colônias formadas.

2.2.3 Análises Estatística

Foram realizados para ambos experimentos uma análise de variância (Teste F), seguindo do teste de Tukey para a comparação das médias com $P < 0,05$ de erro, para as variáveis qualitativas. Para a diferenciação das variáveis quantitativas, realizou-se uma análise de regressão com o auxílio do programa Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2011).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Ensaio Antimicrobiano com *Colletotrichum lindemuthianum*

Foi observado que na concentração zero, testemunha, as médias de germinação dos conídios foram superiores a 50%, considerando-se que a interferência de fatores externos não controláveis possam ter contribuírem no sentido de desfavorecer um maior percentual germinativo (Tabela 1). Apesar disso, foi observado que as médias percentuais dos quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn nas concentrações 0,25; 0,50 e 0,75%, foram bem inferiores a

testemunha, decrescendo cerca de 25% na germinação dos conídios de *C. lindemuthianum*.

A maior concentração empregada de Ca (1%), diferiu estatisticamente entre os produtos testados com 30% de germinação dos conídios, em contrapartida, os tratamentos Cu, Mn e Zn proporcionaram controle *in vitro* superior a 90% nos conídios de *C. lindemuthianum* (Tabela 1). Cassava (2016), avaliando o efeito antimicrobiano *in vitro* de Gel de clorexidina a 2% e hidróxido de cálcio em *Enterococcus faecalis*, não encontrou efeito antibacteriano relevante no número de unidades formadora de colônias (UFC) do patógeno em questão.

Possivelmente, a esse resultado atribui-se o fato do elemento Ca possuir um papel fundamental no processo de divisão e desenvolvimento celular, na estrutura da parede celular e na formação da lamela média, sendo praticamente imóvel em alguns tecidos, o que justificaria sua ação parcial antimicrobiana.

Tabela 1. Número de conídios germinados de *Colletotrichum lindemuthianum in vitro*, após o fornecimento de quelatos metais-aminoácidos de cobre (Cu), manganês (Mn), cálcio (Ca) e zinco (Zn) nas concentrações 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1%.

	-----Concentrações (%)-----					
Tratamentos	0,0	0,25	0,50	0,75	1,00	Média
Cu	52,75 a	2,50 a	2,25 a	3,00 a	3,50 a	12,8
Mn	54,75 a	6,25 a	2,50 a	3,75 a	3,25 a	14,1
Ca	53,75 a	6,00 a	11,50 a	20,25 a	30,00 b	24,3
Zn	55,25 a	6,50 a	11,00 a	5,00 a	8,50 a	17,25
Média	54,13	5,32	6,82	8,00	11,32	17,11
CV (%)						62,28
DMS						8,92

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Com relação aos resultados obtidos com a análise de regressão, o modelo quadrático melhor se ajustou para explicar os fenômenos referentes as avaliações antifúngicas, sendo os pontos de máximo estimados (\hat{Y}) de 105,3 (Cu), 104,0 (Mn), 88,1 (Ca) e 74,9 (Zn) (Figura1).

Os resultados demonstraram que a menor concentração, ou seja, 0,25%, foi responsável por uma inibição superior a 90% de conídios não germinados de *C. lindemuthianum* (Figura 1), *in vitro*. Isto indica que os quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn interferem negativamente no processo de sobrevivência e/ou disseminação desse patógeno, em todos os produtos testados.

Além da nutrição mineral, os nutrientes fazem parte de uma complexa sequência de eventos bioquímicos e fisiológicos, que agem tanto no estrutural do vegetal como metabolicamente nos agentes patogênicos, podendo alterar a resistência das estruturas por modificações anatômicas (lignificação), e/ou na produção de substâncias inibidoras (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

Resultados encontrados por Hennipman (2017), que avaliava os efeitos sobre o índice de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* (causador do mofo branco em feijoeiro), sob diferentes tratamentos, dentre eles, o Fosfito de Manganês, Fosfito de Cobre e o Wert plus® (contendo 4% de zinco em sua composição), observou que esses controlaram 95, 98 e 100% respectivamente a doença em questão.

Harms (2016), testando diferentes produtos alternativos no controle de antracnose no feijoeiro, dentre eles um fertilizante foliar Rocksil®, o qual possui 2% de Ca em sua composição, constatou que para inibir 100% o crescimento micelial do patógeno, era necessário a utilização da maior concentração, ou seja, 1000 µg mL⁻¹.

Os elementos manganês e zinco são responsáveis por diversas ativações enzimáticas das membranas do vegetais, o que especula-se estender a outros organismos vivos, como os microrganismos nessa pesquisa estudados.

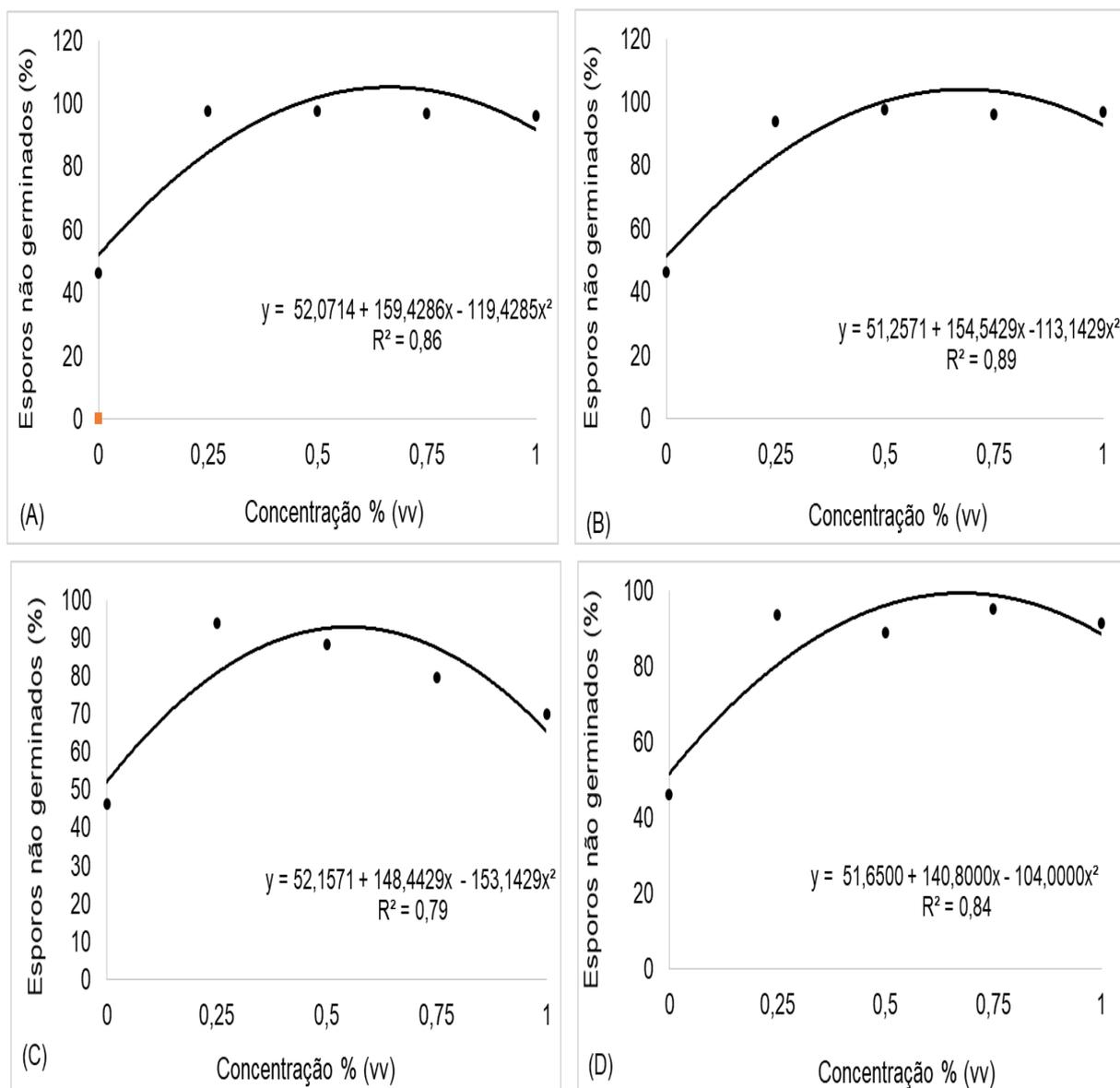


Figura 1. Porcentagem de conídios não germinados de *Colletotrichum lindemuthianum* sob produtos quelatos metais-aminoácidos de Cu (A), Mn (B), Ca (C) e Zn (D), nas concentrações 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%, *in vitro*.

2.3.2 Ensaio Antimicrobiano com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

A concentração zero, ou testemunha não diferiu para as médias de colônias formadas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Já a partir da concentração 0,25%, o número de bactérias desenvolvidas a partir dos quelatos metais-aminoácidos diferiram estatisticamente entre si, ocorrendo um decréscimo nos valores referente a aplicação de Mn, Ca e Zn (Tabela 2).

Tabela 2. Médias de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* formadas *in vitro*, após o fornecimento de quelatos metais-aminoácidos de cobre (Cu), manganês (Mn), cálcio (Ca) e zinco (Zn) nas concentrações 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1%.

Tratamentos	-----Concentrações (%)-----					Média
	0,0	0,25	0,50	0,75	1,00	
Cu	225,20 a	235,80 a	212,00 a	204,20 a	196,80 a	214,80
Mn	224,20 a	187,20 b	202,80 a	183,60 a	191,60 a	197,88
Ca	226,40 a	195,40 b	202,00 a	190,40 a	202,00 a	203,24
Zn	226,00 a	172,00 b	75,80 b	77,60 b	71,60 b	124,60
Média	225,45	197,60	173,15	163,95	165,50	185,13
CV (%)						11,64
DMS						16,02

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A partir da concentração 0,50 até a 1% dos quelatos metais-aminoácidos, observou-se um comportamento padrão nas médias de colônias formadas, onde o tratamento Zn diferiu dos demais, reduzindo drasticamente a quantidade de células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, formadas (Tabela 2).

Resultados similares a esse foram encontrados por Silva et al. (2016), quando testavam diferentes concentrações de fosfito de zinco e sulfato de zinco, no controle de *Oidium eucalypti*. Os autores concluíram que ambos os produtos apresentaram efeitos fungitóxicos, causando modificações morfológicas no patógeno em questão.

A ação fungitóxica e antimicrobiana associadas ao fornecimento do elemento zinco, *in vitro*, na planta ou via solo é comprovada em pesquisas; ocasionado de um lado alterações benéficas no controle de fitopatógenos, de outro, mostrando a essencialidade do elemento no crescimento, esporulação e virulência de determinados patógenos (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993). Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa com o elemento reduzindo *in vitro* o número de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, estão restritos aos produtos, concentrações e condições aqui descritas.

Para as avaliações antibacterianas, o modelo que melhor se ajustou foi o quadrático, sendo o ponto de máximo estimado para o tratamento Cu de $(\hat{Y}) = 224,5$,

e os de mínimo para os tratamentos Mn (\hat{Y}) = 186,8, Ca (\hat{Y}) = 192,3 e Zn (\hat{Y}) = 67,6 (Figura 2).

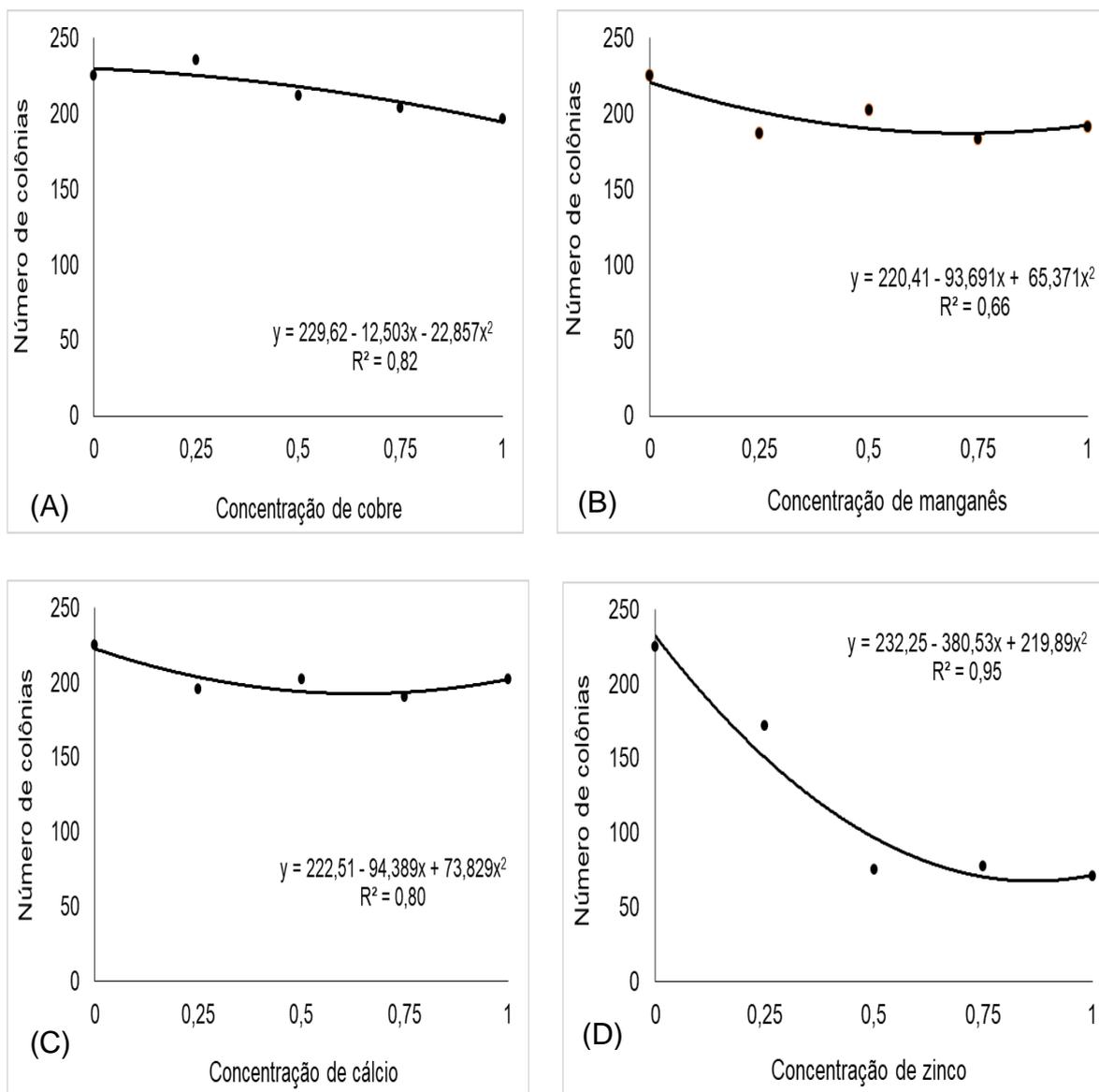


Figura 2. Número de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* sob produtos quelatos metais-aminoácidos de Cu (A), Mn (B), Ca (C) e Zn (D), nas concentrações 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%, *in vitro*.

Para o quelato metal-aminoácidos de Cu, o número de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* não obteve grandes variações em relação as concentrações dos produtos, destacando a de 0,25% com um aumento na média do número de colônias formadas (Figura 2 A). Divergentemente desse resultado, Nascimento et al. (2010), testando a ação *in vitro* de produtos químicos, dentre eles o hidróxido de cobre WP e o hidróxido de cobre WDG, sobre *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*,

em seis dosagens distintas, constataram que, em ambos produtos cúpricos, nas quatro menores dosagens não houve o desenvolvimento das bactérias, sendo que a formação do halo bacteriano só apareceu na maior concentração (100 vezes maior que a dosagem recomendada do produto comercial).

Para os quelatados metais-aminoácidos de Mn e Ca (Figura 2 B e C), nota-se um comportamento semelhante, ou seja, uma diminuição pouco representativa na média de colônias formadas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Alves (2012), testando teores de Ca^{+2} e Mg^{+2} sobre *Ralstonia solanacearum*, concluiu que as diferentes doses de CaSiO_2 , não influenciaram no crescimento *in vitro* da bactéria, não diferindo da testemunha independente da dosagem estudada.

Com relação ao tratamento quelato metal-aminoácidos de Zn, o qual comportou-se divergente em comparação aos demais, destacou-se apresentando uma queda acentuada de 67% no número de colônias formadas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Figura 2 D). Fazendo inferência a esse comportamento, notou-se que o menor número de colônias formadas se deu na concentração 0,5%, mantendo-se praticamente constante na sequência, verificando o potencial bactericida desse produto. Resultados encontrados por Borba e Belinni (2013), estudando a influência de sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em meio ágar-água, concluíram que na maior concentração (10 mM) praticamente não houve crescimento micelial.

2.4 CONCLUSÕES

Os quelatos metais-aminoácidos de cobre, cálcio, manganês e zinco inibiram *in vitro* a germinação de conídios de *C. lindemuthianum*, sendo a concentração 0,25% para todos os produtos, a responsável pela maior inibição.

Para o número de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* constatou-se que apenas o quelato metal-aminoácidos de zinco apresentou potencial antibacteriano, a partir da concentração de 0,25%.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. L.; NUNES, M. Uso de *Trichoderma* spp. no controle de doenças da cultura do feijoeiro. **Revista Técnico-Científica**, v. 1 n. 4, p. 01-14, 2016.
- ALVES, A. O. **Controle alternativo da murcha bacteriana do pimentão utilizando óleos essenciais vegetais e silicato de cálcio**. 2012. 94 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- BORBA, A.L.C.; BELLINI, J.S. Influência do sulfato de zinco no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em tabaco. In: Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar, 2013, Camburiú, PR. **Instituto Federal Catarinense**. Camburiú: MICTI, 2013. Disponível em: < <http://micti-2013.ifc.edu.br/anais/resumos/trab00164.pdf>>. Acesso em: 12 Mai. 2018.
- CASSAVA, L. R. R. **Eficacia antibacteriana in vitro del gel natural de Aloe Barbadensis, Clorhexidina e hidróxido de Cálcio sobre Enterococcus faecalis ATCC 29212**. 2016. 61 f. Tese (Cirurgia Odontológica) - Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo – Peru, 2016.
- CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.
- COSTA, R. C.; ISHIDA, A. K. N.; MIRANDA, V. S.; DAMASCENO FILHO, A. S.; SILVA, C. T. B.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, L. C. Extratos vegetais, formulações a base de extrato vegetal e produtos químicos no controle da mancha bacteriana do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 26-33, 2017.
- DILDEY, O. D. F.; BARBIAN, J. M.; GONÇALVES, E. D. V.; BROETTO, L.; ETHUR. L. Z.; KUHN, O. J.; BONETT, L. P. Inibição do crescimento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, p. 132-136, 2014.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema de análise estatística computacional. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- HARMS, M. G. **Controle da Antracnose em feijão com produtos alternativos**. 2016. 76 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.
- HENNIPMAN, H. S. **Produtos bióticos e abióticos no controle de mofo branco na canola e mancha angular no feijão**. 2017. 171 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.

LENZ, G. COSTA, I. F. D.; ARRUÉ, A.; CORADINI, C.; DRESSLER, V. L.; MELLO, P. A. Severidade de doenças e manutenção da área foliar verde em função da aplicação de micronutrientes e fungicidas em trigo. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 2, p. 119-124, 2011.

LOPES, L. N. S.; SILVA, A. S.; PEREIRA, C. C. O.; MENEZES, I. P. P.; MALAFAIA, G.; PAZ-LIMA, M. L. Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 106-114, 2015.

LUCARINI, A. C.; SILVA, L. A.; BIANCHI, R. A. C. Um sistema para a contagem semi-automática de microorganismos. **Pesquisa e Tecnologia**, n. 26, p. 36-40, 2004.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2.ed. Recife: UFRPE, 2005.

MOHAMMADI, P.; KHOSHGOFTARMANESH, A. H. The effectiveness of synthetic zinc (Zn)-amino chelates in supplying Zn and alleviating salt-induced damages on hydroponically grown lettuce. **Scientia Horticulturae**. v. 172, p. 117–123, 2014.

MORAES, S. R. G.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; CARVALHO, J. G.; SOUZA, P. E. Nutrição do feijoeiro e intensidade da antracnose em função da aplicação de silício e cobre. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 283-291, 2009.

NASCIMENTO, A. R., FERNADES, P. M; QUEZADO-DUVAL, A. M. Ação *in vitro* de produtos químicos sobre *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 1175-1182, 2010.

NASCIMENTO, L. C.; NERY, A. R.; RODRIGUES, L. N. Controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro, utilizando extratos vegetais, indutores de resistência e fungicida. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 313-319, 2008.

NOZAKI, M. H.; KLIEMANN, O. A. Avaliação do uso de fosfito no controle da antracnose em feijoeiro comum. **Agrarian**, v. 9, n. 31, p. 19-25, 2016.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; TEIXEIRA, H.; LOBO JÚNIOR, M.; WENDLAND, A. Doenças do feijoeiro: estratégias integradas de manejo. In: CARNEIRO, J. E. S.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão do plantio a colheita**. 1.ed. Viçosa-MG: Editora, UFV, 2014.

POLTRONIERI, T. P. S.; AZEVEDO, L. A. S.; SILVA, D. E. M. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 4, p. 281-285, 2013.

RUFINO, C. P. B.; ARAÚJO, C. S.; NOGUEIRA, S. R. Desafios na utilização do controle biológico de doenças de plantas na Amazônia. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**. v. 5, n. 1, p. 248-262, 2018.

SILVA, A. C.; REZENDE, M. L. V.; SOUZA, P. E.; PÔSSA, K. F.; SILVA JÚNIOR, M. B. Extrato vegetal, fosfato e sulfato de zinco no controle do oídio em eucalipto. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 93-100, 2016.

SILVA, E. G.; MOURA, A. B.; DEUNER, C. C.; FARIAS, D. R. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Ceres**, v. 55, n. 5, p. 377-383, 2008.

TOILLIER, S. L.; IURKIV, L.; MEINERZ, C. C.; BALDO, M.; VIECELLI, C. A.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 1, p. 99-110, 2010.

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnopus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2010.

WENDLAND 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. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 383-395, 2016.

ZACARONI, A. B. **Formulações à base de extratos vegetais combinados ou não com indutores e fertilizantes foliares no manejo de bacterioses do algodoeiro e do feijoeiro**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Resistência a doenças induzidas pela nutrição mineral das plantas. **Informações Agronômicas Potafos**, v. 1, p. 1-16, 1993.

3 ARTIGO 2: EFEITO DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO FEIJOEIRO A *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de quelatos metais-aminoácidos na indução de resistência do feijoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, responsável pelo crestamento bacteriano comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Os experimentos foram conduzidos em blocos casualizados, com cinco tratamentos: testemunha e quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn, com quatro repetições. No ensaio em que as plantas foram mantidas sob cultivo protegido, foram feitas avaliações enzimáticas de peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e β -1,3 glucanase, e contabilizou-se a severidade da doença. Nos ensaios de campo avaliou-se a severidade da doença e as variáveis agrônômicas altura de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de 100 grãos, em dois locais de cultivo. Os dados foram submetidos a análise de variância, comparados pelo teste Tukey ($P < 0,05$), sendo realizada uma análise conjunta para os valores de campo. Para a severidade, aplicou a fórmula da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Conclui-se que as atividades enzimáticas, exceto a β -1,3 glucanase, apresentaram incrementos após a pulverização dos produtos, seguindo de queda pós inoculação da bactéria. A menor AACPD ocorreu pelo tratamento Ca e Zn em cultivo protegido. A campo, houve incremento no número de vagens por planta, com o fornecimento do biometal de Cu, em um dos locais. Constatando as variações nos fatores avaliados, tanto em cultivo protegido quanto a campo, conclui-se que os quelatos metais-aminoácidos possuem potencial de indução de resistência no feijoeiro contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Palavras-chave: fertilizante foliar, crestamento bacteriano comum, enzimas de defesa vegetal, *Phaseolus vulgaris*, biometais.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the potential of metal-aminoacid chelate to induce resistance of common bean to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, responsible for common bacterial blight in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The experiments were conducted in randomized blocks with five treatments: control and metal-aminoacid chelates of Cu, Mn, Ca and Zn (following the manufacturer's recommendation doses) with four replicates. From the protected cultivation, enzymatic evaluations of peroxidase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase and β -1,3 glucanase were carried out and the severity of the disease was counted. In the field trials the disease severity and the agronomic variables plant height, number of pods per plant, number of grains per pod and mass of 100 grains were evaluated in two cultivation sites. The data were submitted to analysis of variance, compared by the Tukey test ($P < 0.05$), and a joint analysis was performed for field values. For severity, he applied the area under the disease progress curve (AUDPC). It was concluded that enzymatic activities, except for β -1,3 glucanase, presented increases after spraying of the products, following a fall after inoculation of the bacterium. The lowest AUDPC occurred by treatment Ca and Zn in protected culture. In the field, there was an increase in the number of pods per plant, with the supply of Cu biometal in one of the sites. It is concluded that the chelates metals-aminoacids have resistance-inducing potential in the common bean against *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Key words: foliar fertilizer, common bacterial blight, plant defense enzymes, *Phaseolus vulgaris*, biometals.

3.1 INTRODUÇÃO

O cultivo do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é fundamentalmente importante no Brasil, em razão das características culturais alimentícias da população, as quais englobam a participação dominante do grão (PAULA JÚNIOR et al., 2014). A diversidade edafoclimática brasileira permite que o cultivo da leguminosa seja extensivo e expansivo, no entanto, o mesmo fator possibilita o desenvolvimento de agentes bióticos limitantes a expressão agrônômica do feijão. Relacionados a

cultura, são descritas mais de 300 pragas existentes, sendo que as doenças, encabeçam grande porcentagem desse grupo (BORÉM; CARNEIRO, 2015).

O crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) é uma importante bacteriose de ocorrência ampla e generalizada nos cultivos de feijão, principalmente em climas quentes e úmidos, atingindo estruturas como caule, folhas, vagens e sementes, ocasionando reduções de até 70%, comprometendo assim a produtividade (WENDLAND et al., 2016).

Pesquisas acerca do controle alternativo de doenças em plantas são imprescindíveis, em virtude dos prejuízos do uso sucessivo de moléculas químicas, para tanto, alternativas vem surgindo nesse sentido (COSTA et al., 2017). A exemplo dessas, destaca-se a indução de resistência, a qual pode ser desencadeada via aplicação de produtos foliares, os quais promovem alterações fisiológicas nas plantas capazes de suprimir ações patogênicas (STANGARLIN et al., 2011).

A capacidade da planta de se defender a ataques de patógenos, seja atrasando a entrada deste ou mesmo impedindo, é denominada de resistência do hospedeiro, a qual pode ser desencadeada através de mecanismos pré-existentes ou pós-formados em relação à infecção (PINHEIRO et al., 1999). Estudos mostram que alguns produtos, chamados indutores, são capazes de induzir essa resistência, realizando o controle dos microrganismos virulentos (VIGO et al., 2012).

Os quelatos são moléculas que possuem uma estrutura química definida, onde se tem um metal ligado a duas moléculas de aminoácidos, conferindo a neutralidade de carga a esta molécula (DOTTA et al., 2008). Por consequência, estas possuem tamanho muito reduzido (menor que 4 a 5 angstroms), que, aliado a ausência de carga, facilitam a absorção (ASHMEAD, 1986). Em suma, os produtos são altamente biodisponíveis, sendo absorvidos e metabolizados rapidamente, e além do mineral a planta também absorve os aminoácidos (SANTOS et al., 2013a).

Uma das maneiras de detectar a ativação da indução de resistência, seja em função do fertilizante ou patógeno, seria através da verificação da atividade enzimática, como das peroxidases. Estas enzimas, além de reforçar a parede celular pela síntese de lignina, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, como H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), as quais apresentam ação antimicrobiana e podem induzir a síntese de fitoalexinas (GASPAR et al., 1982).

Outro exemplo é a polifenoloxidase, a qual catalisa a oxidação de fenóis para quinonas, na presença de oxigênio (THIPYAPONG; STEFFENS, 1997), além das β -1,3 glucanases que liberam fragmentos glicosídicos, que atuam na degradação da parede celular do patógeno, dificultando ou impedindo sua ação patogênica (JIRKU et al., 1980). A fenilalanina amônia-liase atua na rota dos fenilpropanóides na síntese de compostos fenólicos, como algumas fitoalexinas e a síntese de lignina (JONES, 1984).

Desta maneira, o entendimento da interação entre feijoeiro, quelatos metais-aminoácidos e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pode colaborar no sentido de ampliar o leque de medidas de controle, além de complementar o fornecimento de nutrientes essenciais as plantas.

O uso de quelatos metais-aminoácidos influencia nas ativações enzimáticas e nas variáveis agronômicas do feijoeiro, interferindo no desenvolvimento do agente patogênico intrínseco a cultura.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial de fertilizantes quelatos metal-aminoácidos de cobre (Cu), manganês (Mn), cálcio (Ca) e zinco (Zn) na indução de resistência do feijoeiro para controle do cretamento bacteriano comum.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção e manutenção da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

O inóculo utilizado se encontrava no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *Campus* de Marechal Cândido Rondon - PR. A obtenção se deu a partir de culturas estoque de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, as quais haviam sido coletadas em áreas experimentais da região oeste do Paraná e permaneciam preservadas em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967). O cultivo e multiplicação da bactéria foi pelo método de estrias em placas de Petri contendo meio ágar-nutriente, com incubação a 28 °C por 48 horas e fotoperíodo de 12 horas (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

Para a obtenção da curva de crescimento bacteriano, foram aferidas diferentes concentrações de suspensão de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (com a bactéria previamente cultivada) e realizou-se leituras em espectrofotômetro a 580

nm; a partir dos valores, calculou-se as unidades formadoras de colônias (UFCs), ajustadas para a leitura de absorvância de 0,004, que correspondeu a 10^5 UFC mL⁻¹.

3.2.2 Avaliação em cultivo protegido

A estufa cujos estudos foram realizados fica localizada na Estação Experimental de Cultivo Protegido e Controle Biológico Dr. Mário César Lopes (24°33'28" latitude sul e 54°02'43" longitude oeste) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *Campus* de Marechal Cândido Rondon-PR. A estrutura da estufa é envolta por um material plástico e sombrite no topo, onde a temperatura dia/noite aproximada é de 33/24 °C no verão, umidade relativa ≥ 70 % e fotoperíodo de aproximadamente 12 horas.

O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados com cinco repetições, composto de cinco tratamentos, sendo esses: T₁= água (testemunha), T₂= quelato metal-aminoácidos cobre (2 mL L⁻¹), T₃= quelato metal-aminoácidos manganês (2 g L⁻¹), T₄= quelato metal-aminoácidos cálcio (3 g L⁻¹) e T₅= quelato metal-aminoácidos zinco (3 mL L⁻¹).

O cultivo das plantas se deu em vasos de 3 L, onde cada vaso representava uma parcela experimental. A variedade de feijão utilizada foi a IPR Tuiuiú (preto), de hábito de crescimento indeterminado Tipo II, a qual é suscetível ao crestamento bacteriano.

O solo usado para o cultivo foi previamente analisado quimicamente (Tabela 1), a qual demonstrou que a aplicação de calcário não se faria necessária.

Tabela 1. Resultados da análise química do solo para o experimento de feijão conduzido em cultivo protegido em Marechal Cândido Rondon-Pr. UNIOESTE, 2018.

ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO										
P	MO	pH _{CaCl₂}	H+Al	Al ³⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	CTC	V(%)
Mg dm ³	gm ³	0,01 mol L ⁻¹	-----cmol _c dm ³ -----							
9,13	1,37	5,83	2,61	0,00	0,04	7,15	0,74	7,93	10,54	75,23
Micronutrientes										
Cu		Zn			Mn			Fe		
-----Mg dm ³ -----										
8,00		4,30			68,00			54,10		

Além do solo, a mistura continha areia e matéria orgânica (2:1:2), sendo esse material autoclavado (1 h a 120 °C e 1 atm), aguardando-se sete dias até a semeadura.

Foram semeadas cinco sementes por vaso a uma profundidade de 3 cm, e após a emergência das plântulas, estas foram desbastadas, deixando-se apenas duas plantas por vaso, ambas com aspecto vigoroso. A irrigação das mesmas eram feitas de forma manual, uma ou duas vezes ao dia, conforme a necessidade hídrica, até que atingisse a capacidade de campo do solo.

As pulverizações foram realizadas 24 dias após a emergência (estádio fenológico V₃) seguindo a recomendação do fabricante, e a inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (na concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹), foi realizada três dias após a aplicação dos produtos biometais (V₄).

As aplicações dos produtos foram realizadas com o auxílio de um borrifador de pressão acumulada e bico tipo leque em condições climáticas favoráveis, ao final da tarde, com temperaturas amenas (± 26 °C) e umidade aproximada de 70%.

As avaliações da severidade da doença foram realizadas a cada 72 h, iniciando-se três dias após a inoculação, totalizando-se seis avaliações, com auxílio da escala diagramática da severidade do crestamento bacteriano comum (DIAS et al., 2001), e, posteriormente feito o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), segundo Campbell e Madden (1990):

$$AACPD = \sum [(y_1 + y_2) / 2] * (t_2 - t_1)]$$

Onde y₁ e y₂ são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t₁ e t₂, respectivamente.

Foi realizado uma análise de variância, mediante a comparação entre as médias de AACPD pelo teste de Tukey com P < 0,05, com o auxílio do programa de análise estatística Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2011).

3.2.2.1 Análises Bioquímicas e Fisiológicas

As amostras de tecido foliar foram coletas em três etapas: tempo 0, ou seja, anteriormente à aplicação dos tratamentos e à inoculação do patógeno; 72 horas após a aplicação dos produtos (anterior a inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*),

e, 144 horas passadas da pulverização dos produtos biometais, bem como 72 horas posterior à inoculação da bactéria.

3.2.2.1.1 Obtenção e armazenamento das amostras do tecido foliar

Foram coletados folíolos centrais do feijoeiro em folhas completamente expandidas, referentes as amostras destrutivas dispostas em cultivo protegido, descritas no item 3.2.2.. Essas amostras imediatamente após a coleta, tiveram a nervura central destacada e foram envoltas em papel alumínio e acondicionadas sobre refrigeração em caixa de isopor contendo gelo, e encaminhadas em seguida ao processo de congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, no laboratório de Fitopatologia da universidade.

No laboratório, anterior ao início do processamento das amostras para as análises, essas folhas foram homogeneizadas em 4 mL de tampão de acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), e em seguida feita a centrifugação das amostras a 20.000 g por 25 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O teor de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.2.2.1.2 Atividade de peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada pelo método espectrofotométrico direto, através da medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). A reação foi realizada com 100 μL do extrato proteico (refrigerado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) misturado com 2.900 μL de uma solução com 250 μL de guaiacol e 306 μL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,01M (pH 6,0) (a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Foram feitas leituras a 470 nm durante 2 minutos, com intervalos de 15 segundos, sendo expressos os resultados em unidades de absorvância $\text{min}^{-1}\text{ mg proteína}^{-1}$ (U.A. $\text{min}^{-1}\text{ mg proteína}^{-1}$) (DILDEY et al., 2014).

3.2.2.1.3 Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase (PPO) foi determinada de acordo com Duangmal e Apenten (1999), pela mensuração da conversão do catecol em quinona.

O substrato utilizado foi composto por catecol 20 mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). Para a reação a 30 °C, 900 µL do substrato foram misturados com 100 µL de extrato proteico. As leituras foram feitas a cada 10 seg a 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 min. Os resultados foram expressos em unidades de PPO, sendo que uma unidade foi definida como um incremento de absorvância de 0,001 por minuto de reação por mg de proteína total (DILDEY et al., 2014).

3.2.2.1.4 Atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3 glucanase foi avaliada através da dosagem de glicose liberada com a hidrólise da laminarina (TUZUN et al., 1989). Em tubos de ensaio foram adicionados 50 µL de tampão fosfato de sódio (0,01M pH 6,0), mais 100 µL do extrato proteico e 150 µL de laminarina (200 mg mL⁻¹), incubando-se a 40 °C por 1 hora. Passado esse tempo, adicionou-se 4 mL de solução hidrazida do ácido p-hidroxibenzoico - HAPHB, aqueceu-se a 100 °C por 10 min, e resfriou-se em banho de gelo para paralisar a reação. As leituras espectrofotométricas foram feitas a 410 nm, e, posteriormente, comparadas aos padrões de glicose. A curva padrão para a dosagem de carboidratos redutores (glicose) utilizada já havia sido feita anteriormente, a qual seguiu o método de Lever (1972).

3.2.2.1.5 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006). A reação continha 50 µL do extrato proteico misturado com 450 µL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e com 500 µL de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8), a qual foi incubada por 2 h a 40 °C. A absorvância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (controle = 50 µL do extrato proteico + 950 µL de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A atividade enzimática foi expressa em µg de ácido trans-cinâmico min⁻¹ mg de proteína⁻¹, utilizando uma curva padrão para o ácido (DILDEY et al., 2014).

3.2.2.2 Análises Estatística

Foi realizada uma análise de variância para cada tempo de coleta (descrição no item 4.2.2.1.), e diferindo-se as médias, aplicou-se o teste de Tukey com $P < 0,05$, com o auxílio do programa de análise estatística Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2011).

3.2.3 Avaliações a Campo

Foram realizados dois experimentos a campo, em dois locais distintos, sendo um conduzido em uma área experimental da UNIOESTE, localizada na lateral do Cultivo Protegido e Controle Biológico Dr. Mário César Lopes (latitude $24^{\circ}33'27''S$, longitude $54^{\circ}02'40''$) a 406 m de altitude, no município de Marechal Cândido Rondon-PR; e o outro experimento foi conduzido em uma área experimental de uma empresa particular, localizada no município de Toledo-PR (latitude $24^{\circ}39'09''S$, longitude $53^{\circ}50'12''$) a 544 m de altitude.

As condições climáticas de ambos os locais de experimentação foram coletas entre os meses de Agosto a Dezembro, obtendo-se assim os valores das temperaturas mínimas, médias e máximas mensais, bem como da precipitação ocorrida nesse período (Figura 1).

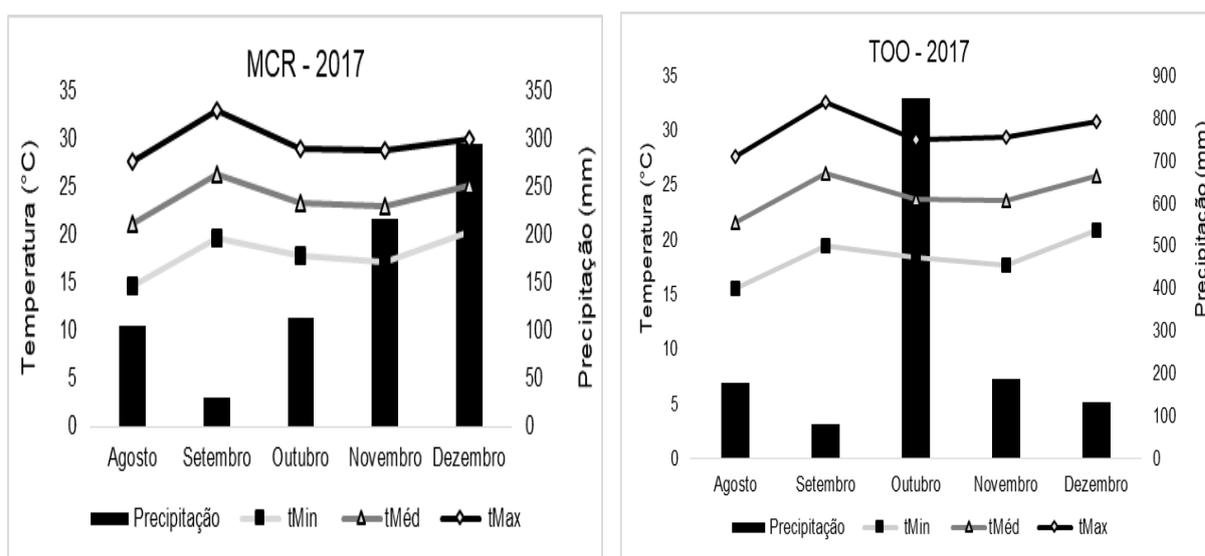


Figura 1. Precipitação (mm), temperatura mínima (tMin), média (tMéd) e máxima (tMax) (°C) dos municípios de Marechal Cândido Rondon (MCR) e Toledo (TOO) – Pr, nos meses de Agosto a Dezembro, período em que realizaram-se dois experimentos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) cultivados em 1ª safra. UNIOESTE, 2017.

Os solos dos locais são classificados como Latossolo Vermelho distroférico profundo, com textura argilosa (SANTOS et al., 2013b).

Aproximadamente 90 dias anterior a semeadura dos experimentos, foram realizadas coletas amostrais de solo, as quais foram analisadas quanto a composição química dos respectivos locais experimentais. Demonstrando que no ensaio de Toledo não houve necessidade de aplicação de calagem, já no de Marechal Cândido Rondon, fez-se necessário a aplicação do calcário magnesiano via lanço, na dose de 1,69 ton ha⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado da análise química do solo para experimentos com feijão em dois locais na região Oeste do Paraná. UNIOESTE, 2017.

Análise química do solo Toledo-PR										
P	MO	pHCaCl ₂	H+Al	Al ³⁺	K+	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	CTC	V(%)
Mg dm ³	gm ³	0,01mol L ⁻¹	-----cmolc.dm ³ -----							
p1 8,80	23,22	5,30	4,28	0,00	0,63	9,68	2,17	12,48	16,76	75
Micronutrientes										
Cu		Zn		Mn		Fe				
-----Mg dm ³ -----										
2,90		3,90		41,20		28,00				
Análise química do solo Marechal Cândido Rondon-PR										
P	MO	pHCaCl ₂	H+Al	Al ³⁺	K+	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	CTC	V(%)
Mg dm ³	gm ³	0,01mol L ⁻¹	-----cmolc.dm ³ -----							
p1 3,90	22,98	5,03	4,96	0,00	0,37	3,79	1,66	5,82	10,78	53
p2 3,50	16,22	5,13	4,96	0,00	0,28	4,21	1,59	6,08	11,04	55
Micronutrientes										
Cu		Zn		Mn		Fe				
-----Mg dm ³ -----										
p1 15,50		5,15		112,36		25,30				
p2 19,52		3,49		43,50		75,57				

p1= profundidade de 0–20 centímetros, p2= profundidade 21-40 centímetros

O delineamento experimental utilizado para ambos experimentos foi o de blocos casualizados com quatro repetições e cinco tratamentos: T₁= água (testemunha), T₂= quelato metal-aminoácidos cobre á 0,5 mL L⁻¹, T₃= quelato metal-aminoácidos manganês á 1 mL L⁻¹, T₄= quelato metal-aminoácidos cálcio á 1 g L⁻¹ e

T5= quelato metal-aminoácidos zinco á 1 mL L⁻¹, todos seguindo a recomendação do fabricante.

As parcelas experimentais eram compostas de 21 m². O experimento possuía comprimento de 30 m e 14 m de largura, com uma área total experimental de 420 m² em cada local. A área útil colhida foi referente às duas linhas centrais com 2 m², excluindo-se as bordaduras (19 m²).

As sementeiras ocorreram no mês de setembro, em sistema de sementeira direta, sendo que em ambos locais a cultura antecessora era aveia. A profundidade das sementeiras foram de 0,03 m, espaçadas a 0,07 m entre plantas e 0,50 m entre linhas, e a cultivar utilizada foi a IPR Tuiuí (Tipo II), preto.

O manejo de plantas daninhas foi realizado com enxada, quando as plantas do feijoeiro se encontravam no estágio fenológico V₂, já os controle dos insetos pragas *Diabrotica speciosa*, *Euschistus heros*, *Spodoptera frugiperda* e *Empoasca kraemeri*, foram feitos nos estádios fenológicos V₆ e R₅ através de pulverizações com os inseticidas Tiametoxam + Lambda-cialotrina na dose de 100 mL ha⁻¹ e acefato na dose de 0,5 kg ha⁻¹, ambos com um volume de calda de 200 L ha⁻¹.

As aplicações dos produtos foram realizadas aos 24 dias após a germinação (V₃) e no início do florescimento (R₆), sendo as pulverizações realizadas 0,2 m acima da cultura, utilizando um pulverizador manual de pressão constante, com bico tipo leque e sob condições climáticas favoráveis, final da tarde, temperaturas amenas (\pm 26 °C), umidade aproximada de 70% e ventos de até 8 km h⁻¹.

A inoculação do patógeno foi feita três dias após a primeira aplicação dos produtos (V₄), sendo feitas seis avaliações de severidade, a cada 72 horas, iniciando-se três dias após a inoculação, com auxílio da escala diagramática de severidade da doença (DIAS et al., 2001).

Os dados contendo as médias da severidade do crestamento bacteriano comum, foram aplicados a fórmula, realizando-se o cálculo da área abaixo da AACPD descritas no item 3.2.2. (CAMPBELL; MADDEN, 1990), referentes aos dois locais de experimentação, submetendo-os à uma análise conjunta (FERREIRA, 2011).

3.2.3.1 Análises Agronômicas

Para os experimentos de campo, após a cultura entrar em maturação fisiológica (R₉), foram avaliados as variáveis agronômicas altura de plantas (ALT) com o auxílio de uma trena, número de vagens por planta (NVP) e número de grãos por vagem (NGV) manualmente, a massa de 100 grãos (MCG) com o auxílio de uma balança digital e a produtividade (PRO).

Os dados foram submetidos a análise de variância (teste F) em nível de 5% de probabilidade de erro. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. Foi realizada a análise conjunta dos dados, sendo esses analisados com o auxílio do programa Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2011).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Cultivo Protegido

O tratamento testemunha diferiu-se do tratamento quelato metal-aminoácidos de Ca e Zn, quando avaliada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Figura 1). Os tratamentos Cu e Mn, apesar de apresentarem médias de AACPD inferiores à testemunha, foram estatisticamente semelhantes a mesma, e ao mesmo tempo, semelhantes ao Ca e Zn (Figura 2).

Resultados similares foram encontrados por Rodrigues et al. (2016), que ao realizarem testes com os biofertilizantes SOIL-SET™ (2% de Cu, 0,8% de Mn e 3,2% de Zn), AGRO MOS™ (3% de Cu e 2% de Zn) e o Cop-R-Quik (complexo de aminoácidos de cobre) sobre *Xanthomonas* sp. em tomateiro, observaram que a AACPD foi inferior à da testemunha, influenciando portanto na redução da severidade da doença.

Itako et al. (2012), avaliando o efeito de produtos químicos, dentre eles o oxiclreto de cobre, sobre a severidade da mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*), bem como na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro, observaram que a AACPD dos produtos diferiu estatisticamente da testemunha, com valores de severidade inferiores.

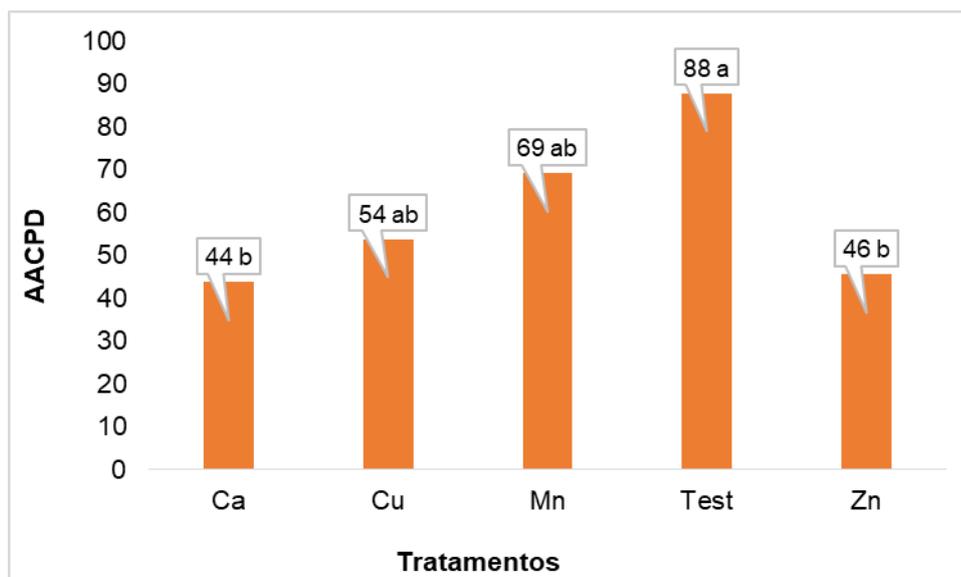


Figura 2. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para o cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, em função da aplicação dos quelatos metais-aminoácidos de cálcio (Ca), cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn), mais a testemunha. A aplicação dos produtos ocorreu no estágio fenológico V₃, 24 dias após a emergência, e as avaliações realizadas com intervalo de 72 horas. A comparação entre as médias de AACPD se deu pelo teste de Tukey com P < 0,05. Coeficiente de variação de 18,58%. UNIOESTE, 2018.

Além desses resultados, os autores (ITAKO et al., 2012) concluíram que houve maior produção das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3 glucanase e ainda, que nenhum genótipo de tomateiro ensaiado respondeu à produção da enzima fenilalanina amônia-liase, aos 1, 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação da bactéria, semelhantemente ao ocorrido nessa pesquisa quanto a quantificação da atividade enzimática (Figuras 5, 4, 6 e 3, respectivamente). Acordando com os autores, esses resultados possivelmente se devam ao fato de haver uma redução na severidade da doença, verificada pela diminuição da AACPD, equivalente ao ocorrido nesse estudo (Figura 2).

Mello et al. (2017), avaliando o efeito de indutores de resistência no controle da podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* em couve-chinesa, observaram dentre outros produtos testados que o Agro-Mos[®], o qual é derivado de sulfato de cobre e sulfato de zinco (3% de Cu e 2% de Zn), obtiveram uma redução na AACPD de 51,5%, similarmente ao ocorrido nesta pesquisa (Figura 2).

Por outro lado Mello et al. (2017), observaram que não houve resposta significativa ao óxido de cálcio na severidade da doença, diferindo do resultado desta pesquisa (Figura 2). Os mesmos autores avaliaram ainda a atividade de enzimas, concluindo que aos 14 dias houve aumento na atividade da peroxidase

para o fertilizante foliar Agro-Mos[®], semelhantemente ao ocorrido nesse estudo às 72 horas após a aplicação do quelato metal-aminoácidos de Zn e Cu (Figura 5).

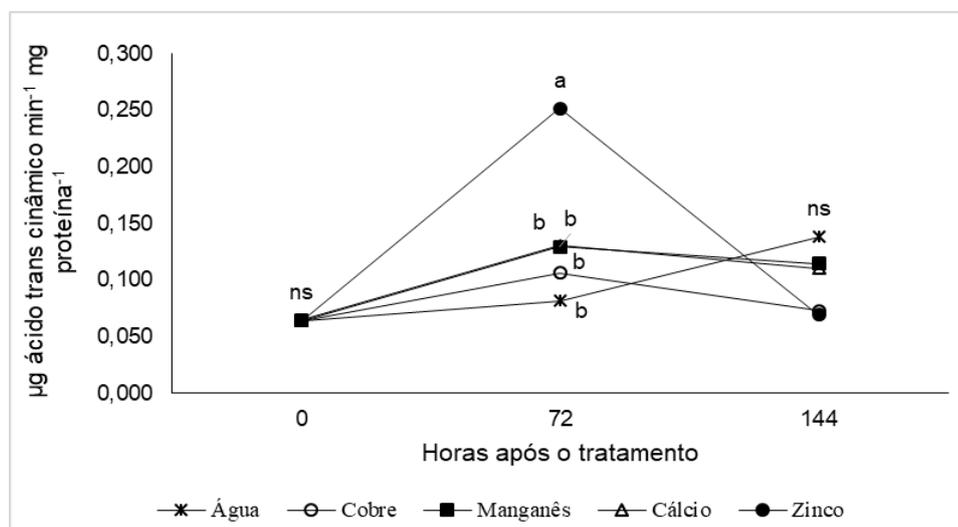


Figura 3. Atividade da fenilalanina amônia-liase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (na concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P < 0,05. N.S.: não significativo.

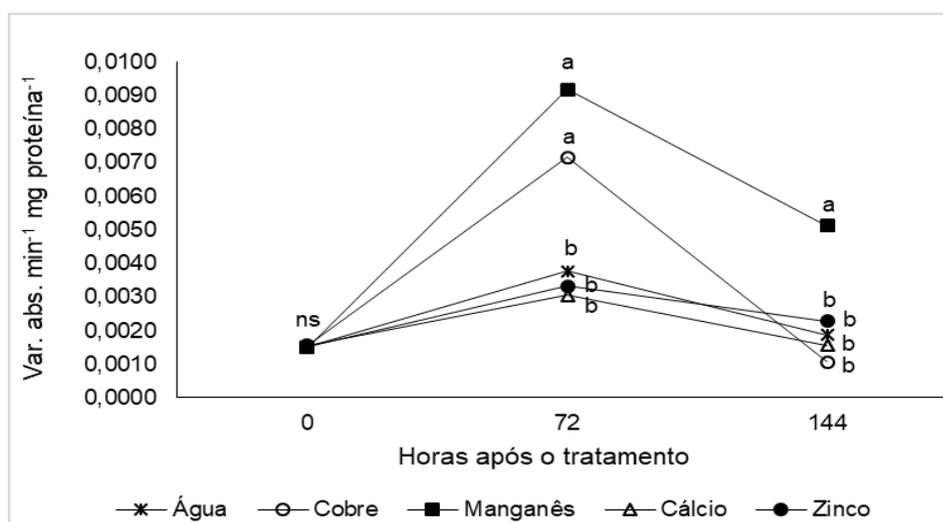


Figura 4. Atividade da polifenoloxidase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca, Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (na concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹) ocorreu 72 horas após tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P < 0,05. N.S.: não significativo.

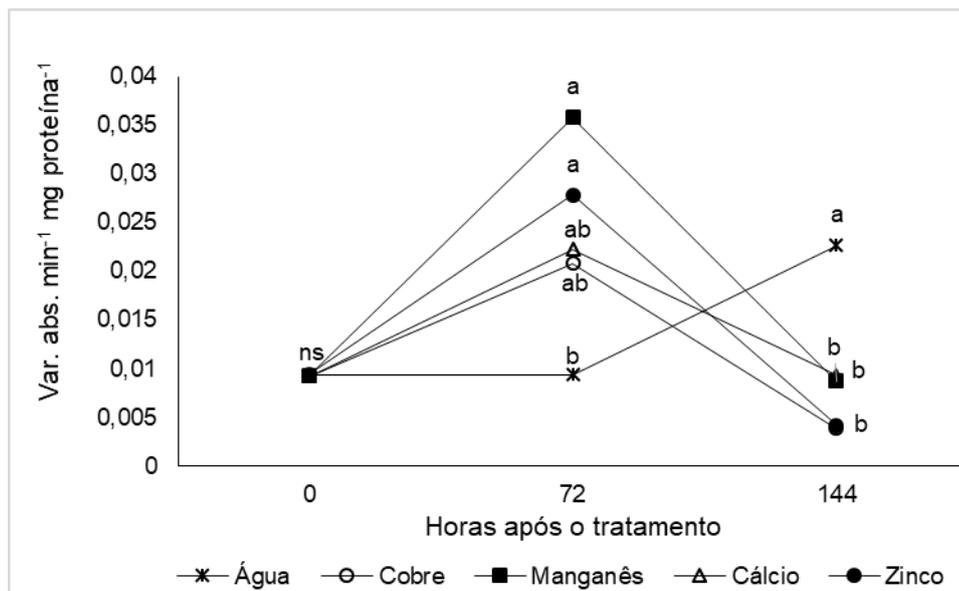


Figura 5. Atividade da peroxidase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca, Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (na concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹) ocorreu 72 horas após tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P <0,05. N.S.: não significativo.

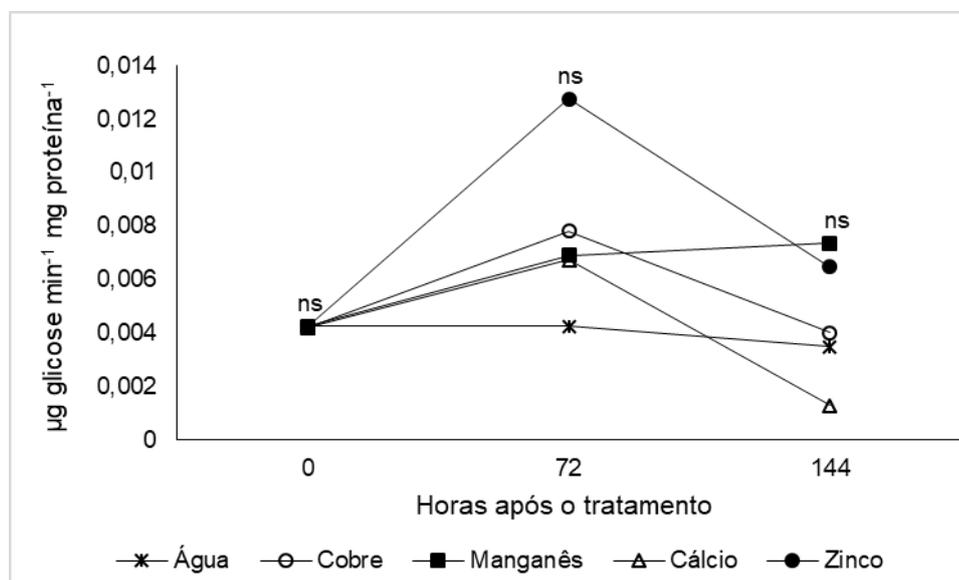


Figura 6. Atividade da β-1,3 glucanase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca, Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (na concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹) ocorreu 72 horas após tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P <0,05. N.S.: não significativo.

Com relação as atividades enzimáticas, observa-se que para todas as enzimas avaliadas, houve incremento apenas 72 horas após a aplicação dos fertilizantes foliares, não se observando incrementos após a inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Figuras 3, 4, 5, 6). Para o tratamento testemunha, observou-se incremento na atividade da peroxidase (Figura 5), passadas 72 horas da inoculação do patógeno, indicando que isto pode ter ocorrido em função do processo infeccioso e tentativa de defesa da planta hospedeira. De acordo com Lobarzewski et al. (1991) e Rossi et al. (1997), a atividade da peroxidase pode ter um acréscimo devido a diversos fatores de estresse, como ferimentos, infecção de patógenos, salinidade, déficit hídrico, déficit nutricional, dentre outros, acarretando muitas vezes, além do aumento da síntese de lignina, a de etileno.

Na atividade da fenilalanina amônia-liase foi observado um pico de acréscimo 72 horas após a aplicação do fertilizante quelatado metal-aminoácidos de Zn, diferindo esse da testemunha e dos demais tratamentos (Figura 3). Silva Júnior (2013) encontrou resultados semelhantes quando avaliou o teor de FAL horas após a infecção de *Phoma* no cafeeiro tratado com um fertilizante foliar composto de macro e micronutrientes (contendo 5% de Zn em sua composição), o qual teve um incremento da enzima citada 96 horas após a aplicação do produto, com posterior queda, divergindo da testemunha e dos demais tratamentos. Relacionando ao resultado da baixa porcentagem de AACPD (Figura 2), o quelato metal-aminoácidos de Zn evidencia o potencial na ativação da rota de compostos de defesa em feijoeiro, destacando-se o fato do produto ser composto por aminoácidos, que servem de substrato, ou agindo como cofatores na rota dos fenilpropanóides.

Para a atividade de polifenoloxidase, foi observado que 72 horas após a pulverização dos produtos, houve um aumento enzimático para os produtos quelatos metais-aminoácidos de Cu e Mn, com posterior queda após a inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Figura 4). Gadaga et al. (2017) encontraram comportamentos divergentes em suas pesquisas, os quais, avaliando o efeito do fosfito de Mn na atividade enzimática do feijoeiro, observaram que não houve alteração nos níveis da polifenoloxidase até o sexto dia após o tratamento, havendo alterações a partir de 7,5 dias e em plantas que não foram inoculadas com o patógeno.

Para as atividades da β -1,3 glucanase, os valores não tiveram diferenças significativas, muito embora, equipararam-se ao comportamento das demais enzimas, as quais cresceram 72 após a pulverização dos fertilizantes, e na sequência, decresceram (Figura 6). Bruzamarello et al. (2018), avaliando o potencial de produtos à base de fosfitos, dentre eles o de cobre na ativação da resistência sistêmica adquirida em plantas de soja, constataram que para a enzima β -1,3 glucanase, o tratamento com cobre apresentou atividade somente 192 horas após a aplicação dos tratamentos. Especula-se o fato de os quelatos metais-aminoácidos possuírem um efeito retardado, priorizando ações importantes futuras, agindo na degradação da quitina e glucana presentes na parede celular do patógeno.

3.3.2 Resultados de Campo

Para as avaliações da severidade do crestamento bacteriano comum em ensaios de campo, observou-se que no município de Marechal Cândido Rondon-PR (MCR) a AACPD apresentou médias inferiores se comparado ao município de Toledo-PR (TOO) (Figura 7). Além desse fato, as porcentagens de severidade da doença foram estatisticamente semelhantes, comparando os produtos biometais a testemunha no município de MCR.

No município de Toledo, o produto quelatado metal-aminoácidos de Ca diferiu da testemunha, com a menor AACPD, e apresentou-se semelhante aos demais tratamentos (Figura 7). Relacionado a esse resultado, Gaspar et al. (2015), aferindo porcentagens de macronutrientes no solo, correlacionado a redução da ferrugem asiática da soja, concluíram que, ao disponibilizar 55% de cálcio, 15% de magnésio e 5% de potássio, os nutrientes proporcionam um aumento no equilíbrio nutricional da leguminosa, conferindo uma redução na AACPD da ferrugem, além de aumentar a produtividade.

Taiz e Zeiger (2008), explanam que o elemento cálcio é importante na manutenção da integridade celular e na ativação dos processos de divisão e alongamento celular, sendo um componente essencial na proteção e fortalecimento das plantas a organismos fitopatogênicos.

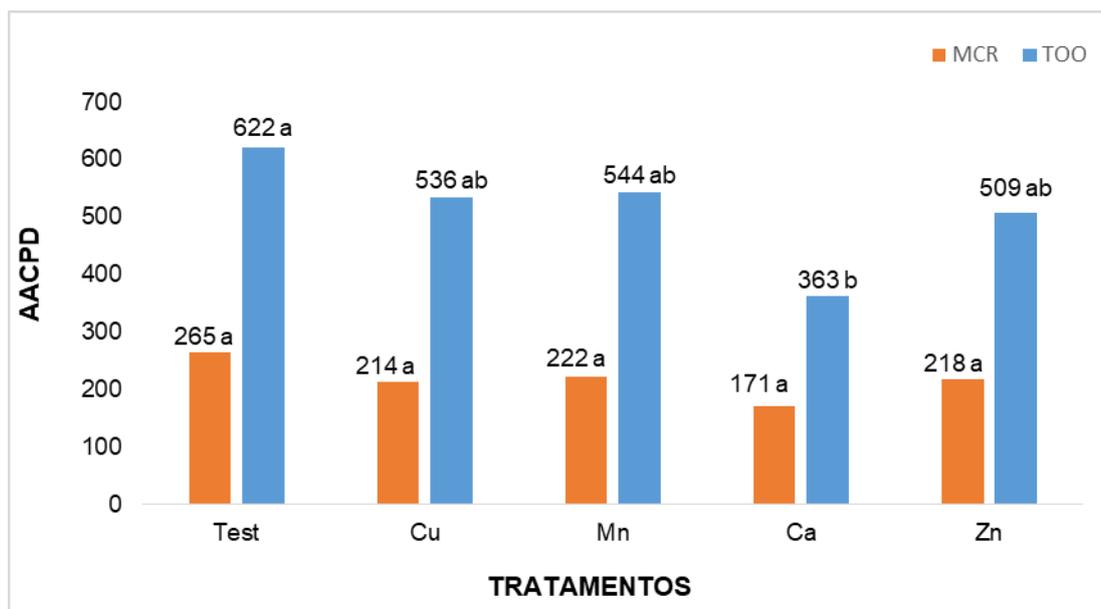


Figura 7. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para o cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) a campo, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* no município de Marechal Cândido Rondon - PR e Toledo - PR, em função da aplicação dos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn, mais a testemunha. As aplicações dos produtos foram efetuadas nos estádios fenológicos V₃ e R₅, sendo as avaliações realizadas com intervalo de cinco dias. A comparação entre as médias de AACPD se deu pelo teste de Tukey com P < 0,05. Coeficiente de variação de 25,39%. UNIOESTE, 2017.

O Ca é um elemento importante na resistência de plantas a patógenos. O papel desse nutriente está relacionado a estruturação e integridade da parede celular e da membrana plasmática, bem como sua função de transporte (MUNIZ et al., 1991). Em razão disso, pesquisas comprovam que a aplicação de Ca via foliar auxilia na redução da severidade de doenças fúngicas e bacterianas.

Com relação aos componentes de rendimento da cultura, observou-se que no município de Toledo as médias mostraram-se superiores para grande maioria das variáveis avaliadas (Tabela 3), mesmo apresentando porcentagens maiores de severidade da doença (Figura 7), podendo inferir que, os altos valores da AACPD não interferiram no rendimento da cultura.

Divergentemente, Truylio (2015), avaliando alguns produtos (V-6[®]: 2,5% Mn e 1,9% Zn; Wert plus[®]: Cu e Zn; Max Fruit[®]: 4,61% de Ca) na indução de resistência do feijoeiro a antracnose, com posterior avaliação dos componentes de rendimento em duas safras, concluiu que os produtos testados não indicaram influência na severidade da doença em ambas as safras, nem sequer os componentes número de

vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de 100 grãos foram afetados.

Tabela 3. Altura de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em função da aplicação de quelatos metais-aminoácidos de cobre, manganês, cálcio e zinco, mais a testemunha, em dois locais de condução, na região Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon (MCR) e Toledo (TOO). 2017.

Experimentos	TRATAMENTOS					Média
	Test	Cu	Mn	Ca	Zn	
	-----Altura de plantas (m)-----					
MCR	0,79 aB	0,80 aB	0,78 aA	0,81 aA	0,76 aB	0,79
TOO	0,95 aA	0,99 aA	0,85 aA	0,91 aA	0,94 aA	0,93
Média	0,87	0,90	0,82	0,86	0,85	0,86
CV (%)						8,92
DMS						0,05
	-----Nº de vagens por planta-----					
MCR	13,00 aA	15,05 aA	14,55 aA	16,30 aA	12,30 aA	14,24
TOO	10,25 bA	13,40 abA	18,50 aA	16,10 abA	14,45 abA	14,54
Média	11,63	14,23	16,53	16,20	13,37	14,39
CV (%)						25,84
DMS						5,47
	-----Nº de grãos por vagem-----					
MCR	5,80 aA	5,90 aB	6,20 aA	5,40 aB	5,30 aB	5,70
TOO	6,30 aA	6,70 aA	6,90 aA	6,90 aA	6,70 aA	6,70
Média	6,05	6,30	6,55	6,15	6,00	6,20
CV (%)						7,60
DMS						0,31
	-----Massa de 100 grãos (g)-----					
MCR	19,95 aA	20,05 aB	20,45 aB	19,83 aB	19,67 aB	19,99
TOO	21,28 aA	22,02 aA	22,28 aA	21,24 aA	21,37 aA	21,64
Média	20,62	21,035	21,365	20,535	20,52	20,81
CV (%)						4,58
DMS						0,63
	-----Produtividade (sc ha ⁻¹)-----					
MCR	69,65 aA	82,08 aA	86,94 aB	80,23 aA	58,86 aB	75,55
TOO	64,82 bA	92,65 abA	132,43 aA	110,18 abA	95,83 abA	99,19
Média	67,24	87,37	109,69	95,21	77,35	87,37
CV (%)						28,84
DMS						36,76

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade de erro.

As variáveis número de vagem por planta e produtividade excepcionalmente, obtiveram diferença estatística entre os produtos testados, destacando-se o quelato metal-aminoácidos de Mn, no município de Toledo (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Perozin et al. (2018), que ao estudarem os efeitos da aplicação do Mn (sulfato de Mn quelatizado com EDTA) associados ao glifosato em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de soja, concluíram que apenas para a característica agrônômica número de vagens por planta houve diferença estatística quando pulverizado apenas o Mn (350 g ha^{-1}) nos estádios V₅ e V₉.

Heenan e Campbell (1980) já discorriam acerca das importantes funções do Mn, enfatizando o envolvimento do micronutriente na fotossíntese no processo do O₂ e na fotólise da água, além do envolvimento no metabolismo do nitrogênio, responsável pela redução sequencial do nitrato, além das funções hormonais, nos fenóis e ligninas.

Para as demais variáveis analisadas altura de plantas, número de grãos por vagem e massa de cem grãos, as médias obtidas referente aos produtos testados não diferiram da testemunha. Resultados próximos a esse foram encontrados por Gontijo Neto et al. (2016), os quais testando indutores de resistência no feijoeiro como o silicato de Ca e o fosfito de manganês na severidade da mancha angular e antracnose, bem como dos componentes de rendimento, concluíram que não houve influência dos indutores sobre a progressão das doenças, nem tão pouco, esses proporcionaram alteração nas variáveis altura de plantas, vagens por planta, grãos por vagem e massa de 100 grãos no feijoeiro.

Silva et al. (2016), testando o bioestimulante foliar Biozyme TF[®] (0,12% Mn e 0,37% de Zn) com diferentes concentrações e épocas de aplicação, visando estimular os processos metabólicos e fisiológico do feijoeiro, além do aumento nos patamares de produtividade, concluíram que os componentes de produção não foram influenciados com o uso do bioestimulante.

Por outro lado, Rocha et al. (2015), avaliando o desempenho do feijoeiro sob diferentes concentrações do biofertilizante Agrobio[®] (850 g de cloreto de Ca, 43 g de sulfato de Cu, 86 g de sulfato de Mn, e 57 g de sulfato de Zn, dentre outros componentes), constataram um aumento inicial no número de vagens por planta à medida em que foram acrescidas as concentrações do biofertilizante, e,

sequencialmente, ocorreram decréscimos, referentes as concentrações mais altas; porém, para as variáveis altura de plantas e número de grãos por planta, não houve diferença entre as médias avaliadas.

3.4 CONCLUSÕES

Os quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn apresentaram potencial no controle do cretamento bacteriano comum, com reduções nos valores da AACPD.

Os produtos quelatados metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn ativaram as enzimas FAL, peroxidase e polifenoloxidase 72 horas após o tratamento.

O quelato metal-aminoácidos de Mn promoveu aumento na variável número de vagens por planta e produtividade no município de Toledo-PR, enquanto os demais componentes de rendimento não alteraram com o fornecimento dos biometais.

REFERÊNCIAS

ASHMEAD, H. D. **The absorption mechanism of amino acid chelates by plant cells**. In: ASHMEAD, H. D.; ASHMEAD, H. H.; MILLER, G. W.; HSU, H. H. (Eds.): Foliar feeding of plants with amino acid chelates. Cap. 10th ed. New Jersey: Albion Laboratories, 1986, p. 219-235, 368p.

BRADFORD, 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, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: CARNEIRO, J. E. S.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds.) Feijão do plantio a colheita. Viçosa: Editora UFV, 2015, p. 9-15.

BRUZAMARELLO, J.; FRANCESCHI, V. T.; DALACOSTA, N. L.; GONÇALVES, I.; MAZARO, S. M.; REIS, E. Potencial de fosfitos na indução da resistência em plantas de soja. **Cultura Agronômica**, v. 27, n. 3, p. 263-273, 2018.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York. John Wiley & Sons, 1990.

CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

COSTA, R. C.; ISHIDA, A. K. N.; MIRANDA, V. S.; DAMASCENO FILHO, A. S.; SILVA, C. T. B.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, L. C. Extratos vegetais, formulações a base de extratos vegetal e produtos químicos no controle da mancha bacteriana do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 26-33, 2017.

DIAS, C. G.; BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 1, p. 35-39, 2001.

DILDEY, O. D. F.; BARBIAN, J. M.; GONÇALVES, E. D. V.; BROETTO, L.; ETHUR. L. Z.; KUHN, O. J.; BONETT, L. P. Inibição do crescimento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, p. 132-136, 2014.

DOTTA, J. H.; TEIXEIRA, N. T.; OLIVEIRA, F. C. Micronutrientes e aminoácidos no desenvolvimento em tomateiro cultivado em rizotron. In: FERTIBIO, Londrina, 2008. Anais..., 2008.

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, n. 3, p. 351-359, 1999.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema de análise estatística computacional. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GADAGA, S. J. C.; ABREU, M. S.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M. Fosfitos para o controle da antracnose em feijoeiro comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 1, p. 36-44, 2017.

GASPAR, G. G.; TAKAHASHI, H. W.; CANTERI, M. G.; ALMEIDA, J. C. V.; FIORETTO, R. A.; ANDRADE, B. L. G.; FANTIN, L. H. Balance among calcium, magnesium and potassium levels affecting Asian Soybean Rust severity. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 1, p. 39-44, 2015.

GASPAR, T. H.; PENEL, C. L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève: Université de Genève, 1982. 324p.

GONTIJO NETO, G. F. G.; ANDRADE, M. J. B.; POZZA, E. A.; MARTINS, F. A. D.; SOARES, B. L.; BELAN, L. L.; CARDILLO, B. E. S. Controle da antracnose e da mancha angular do feijoeiro comum com indutores de resistência. **Nucleus**, v. 13, n. 2, p. 199-208, 2016.

ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. **Idesia**, v. 30, n. 2, p. 85-92, 2012.

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1349-1359, 1984.

JIRKU, V.; KRAXNEROVÁ, B.; KRUMPHANZL, V. The extracellular system of beta-1,3-glucanases of *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus vesicolor*. **Folia Microbiol**, v. 25, n. 1, p. 24-31, 1980.

HEENAN, D. P.; CAMPBELL, L. C. Soybean nitrate reductase activity influenced by manganese nutrition. **Plant Cell Physiology**, v. 21, n. 4, p. 731-736, 1980.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 273-279, 1972.

LOBARZEWSKI, J.; GREPPIN, H.; PENEL, C. et al. (eds.). **Biochemical, molecular, and physiological aspects of Plant Peroxidases**. Université de Genève, 1991, p. 425-432.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, v. 25, n. 3, p. 244-249, 1999.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. (Coords.). **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. 2.ed. Recife: UFRPE, 2005.

MELLO, M. R. F.; SOUZA, E. B.; PINTO, K. M. S.; GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R. Redução da podridão mole em couve-chinesa mediada por indutores de resistência. **Revista Cientec**, v. 9, n. 2, p. 15-24, 2017.

MUNIZ, M. D. S.; MUCHOVEJ, J. J.; MUCHOVEJ, R. M. C.; ALVAREZ VENEGAS, V. V.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; MAFFIA, L. A. Influence of calcium nutrition on anthracnose of bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 12, p. 2025-2030, 1991.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; TEIXEIRA, H.; LOBO JÚNIOR, M.; WENDLAND, A. Doenças do feijoeiro: estratégias integradas de manejo. In: CARNEIRO, J.E.S.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão do plantio a colheita**. 1.ed. Viçosa-MG: Editora, UFV, 2014.

PEROZIN, A. C.; LAZARINI, E.; ARAÚJO, C.; MARTINOTTO, C.; ALMEIDA JÚNIOR, J. J.; MIRANDA, B. C. Efeito do glifosato e manganês (Mn) na cultura da soja [*Glycine max* L. Merrill]: nutrição de planta e características agrônômicas. **Nucleus**, v. 15, n. 2, p. 279-290, 2018.

PINHEIRO, M. M. et al. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciências Hoje**, v. 147, p. 1-11, 1999.

ROCHA, D. P.; BRITO, M. F.; SANTOS, L. C.; SOUZA, R. L.; GALLO, A. S.; SILVA, R. F. Desempenho do feijoeiro sob o uso de biofertilizante em sistema orgânico de produção. **Acta Iguazu**, v. 4, n. 2, p. 97-109, 2015.

RODRIGUES, V. W. B.; BUENO, T. V.; TEBALDI, N. D. Biofertilizantes no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 94-96, 2016.

ROSSI, C.; LIMA, G. P. P.; HAKVOORT, D. M. R. Atividade de peroxidases (EC 1.11.1.7) e teor de prolina em feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia Agrícola**, v. 54, n. 3, p. 123-127, 1997.

SANTOS, P.C.; TEIXEIRA, N.T.; OLIVEIRA, F.C. **Aminoácidos e micronutrientes no desenvolvimento inicial do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. In: XXXIV Encontro brasileiro de Ciência do Solo, 2013, Florianópolis. Anais..., 2013a.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; OLIVEIRA, J. B.; COELHO, M. R.; LUMBRERAS, J. F.; CUNHA, T. J. F. Sistema brasileiro de classificação de solos. **Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro**, 2013b.

SILVA JÚNIOR, M. B. **Fertilizantes foliares no manejo da mancha de phoma do cafeeiro**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SILVA, R. S.; FOGAÇA, J. J. N. L.; MOREIRA, E. S.; PRADO, T. R.; VASCONCELOS, R. C. Morfologia e produção de feijão comum em função da aplicação de bioestimulante. **Scientia Plena**, v. 12, n. 10, p. 01-07, 2016.

STANGUARLIN, 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.

THIPYAPONG, P.; STEFFENS, J. C. Tomato polyphenol oxidase: differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. **Plant Physiology**, v. 115, n. 2, p. 409-418, 1997.

TRUYLIO, C. E. C. **Efeito de produtos alternativos para o controle da antracnose em feijão**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

TUZUN, S.; RAO, M. N.; VOLGELI, U.; SCHRADER, C. L.; KUC, J. Induced systemic resistance to blue mold: Early induction and accumulation of β 1,3-glucanases, chitinases, and other pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized tobacco. **Phytopathology**, v. 79, n. 9, p. 979-983, 1989.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.

VIGO, S. C.; MARINGONI, A. C.; DE CÁSSIA CAMARA, R.; LIMA, G. P. P. Avaliação de pyraclostrobin e acibenzolar-S-methyl sobre o crestamento bacteriano comum do feijão-vagem. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 1, p. 167-174, 2012.

WENDLAND, A.; MOREIRA, A. S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN, J. S.; LOBO JUNIOR, M. Doenças do feijoeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. v2. 5ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2016, p. 383-396.

4 ARTIGO 3: USO DE QUELATOS METAIS-AMINOÁCIDOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO A *Colletotrichum lindemuthianum*

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito dos quelatos metais-aminoácido na indução de resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causador da antracnose. Foram realizadas experimentação em cultivo protegido e a campo em dois locais (Marechal Cândido Rondon e Toledo – PR), sendo ambos os experimentos realizados em blocos casualizados, com cinco tratamentos: quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca, Zn e a testemunha, com quatro repetições. Foram feitas avaliações da severidade, calculando-se na sequência, a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), para os experimentos de campo e casa de vegetação. Em cultivo protegido, avaliou-se as atividades enzimáticas de peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e β -1,3 glucanase. Nos experimentos de campo, foram quantificados as variáveis agrônomicas altura de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de 100 grãos. Os dados foram submetidos a análise de variância, comparados pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados referentes a severidade da antracnose a campo foram aplicados a fórmula da AACPD, realizando-se uma análise conjunta. A severidade da doença quantificada em cultivo protegido, demonstrou menor AACPD através do tratamento Cu. As atividades enzimáticas apresentaram elevações após o fornecimento dos quelatos metais-aminoácido de Ca para a atividade da fenilalanina amônia-liase, e de Mn para polifenoloxidase e β -1,3 glucanase, com posterior queda após a inoculação do fungo. A AACPD a campo não diferiu entre os tratamentos, somente entre locais, sendo que no ensaio de Toledo-PR observaram-se as menores médias. As variáveis agrônomicas não foram influenciadas pelo fornecimento dos quelatos metais-aminoácidos.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, antracnose, enzimas de defesa, biometais, fungitóxico.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of metal-amino acid chelates on the resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Colletotrichum lindemuthianum*, the pathogenic agent responsible for anthracnose. Experiments were carried out in protected and field cultivation in two locations (Marechal Cândido Rondon and Toledo – PR), both experiments being performed in randomized blocks, with five treatments: metal-amino acid chelates of Cu, Mn, Ca, Zn (following the dosage suggested by the manufacturer) and the control, with four replicates. Severity assessments were performed, calculating the area under the disease progress curve (AUDPC) in the sequence for the field and greenhouse experiments. In protected culture, the enzymatic activities of peroxidase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase and β -1,3 glucanase were evaluated. In the field experiments, the agronomic variables were: plant height, number of pod per plant, number of grains per pod and mass of 100 grains. The data were submitted to analysis of variance, compared by the Tukey test ($P < 0.05$). The data referring to the severity of field anthracnose were applied to the AUDPC formula, and a joint analysis was performed. The severity of the disease quantified in protected culture, demonstrated lower AUDPC through Cu treatment. The enzymatic activities showed elevations after the supply of the amino acid chelates of Ca to the activity of phenylalanine ammonia-lyase, and of Mn to polyphenoloxidase and β -1,3 glucanase, with subsequent drop after inoculation of the fungus. The AUDPC in the field did not differ between treatments, only between sites, and in the Toledo-PR assay the lowest averages were observed. The agronomic variables were not influenced by the supply of metal-amino acid chelates.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, anthracnose, defense enzymes, biometals, fungitoxic.

4.1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) está amplamente associado a culinária brasileira, sendo que o cultivo do grão é realizado em todos os Estados, atribuindo o fato da ampla faixa edafoclimática de adaptação e o elevado grau de aceitação pelos consumidores da leguminosa (TARSITANO et al., 2015).

Apesar desse expressivo cultivo e consumo, a cultura apresenta certas limitações de produção, destacando-se fatores como clima, condições de fertilidade desfavoráveis e a presença de pragas e doenças (STONE et al., 2013).

Nos diferentes sintomas no cultivo de feijoeiro, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma doença de destaque, especialmente na terceira safra ou safra de inverno, sendo as condições extremamente favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, com clima ameno e alta umidade. A importância do fungo se dá em razão da destruição causada por este, que pode ocorrer de forma generalizada na planta, comprometendo todas as estruturas dependendo do grau de infecção, sendo o sintoma típico as manchas necróticas deprimidas nas vagens (CANTERI et al., 1999).

O controle da antracnose é feito basicamente por fungicidas, os quais se utilizados de maneira indiscriminada, podem apresentar toxicidade tanto ao aplicador, quanto ao meio ambiente, além de selecionar indivíduos resistentes sob uso incorreto (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Os fertilizantes foliares vem sendo estudados com uma alternativa suplementativa de nutrientes, e em alguns casos, com outras funções como da indução de resistência por parte da planta a determinados patógenos (GALBIATTI et al., 2011).

A indução de resistência a patógenos é a ativação de mecanismos de defesa já existentes na própria planta, estando o patógeno no sítio de infecção ou não, que são desencadeados por agentes de indução como compostos orgânicos e/ou inorgânicos (PASCHOLATI; DALIO, 2018; BARROS et al., 2010).

Os metais quelatizados por aminoácidos são moléculas com uma estrutura química definida, onde se tem um metal ligado a duas moléculas de aminoácidos, fornecendo não somente uma rápida metabolização e suplementação na planta (devido a seu tamanho reduzido), mais também, a suplementação de aminoácidos

prontos, os quais melhoram a recuperação a estresses, como o ataque de patógenos (COHEN, 1994).

Os quelatos metais-aminoácidos alteram fisiologicamente as plantas de feijoeiro, influenciando-as a reagir com respostas enzimáticas e antimicrobianas ao fitopatógeno *C. lindemuthianum*.

Dessa forma, objetivou-se avaliar a relação dos quelatos metais-aminoácidos com o patógeno *C. lindemuthianum* em feijoeiro, bem como seus efeitos na indução de resistência das plantas, através da avaliação da severidade da antracnose, ativação de enzimas de defesa vegetal e variáveis agronômicas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção e Manutenção do Inóculo *Colletotrichum lindemuthianum*

A preservação e multiplicação do patógeno *C. lindemuthianum* foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), no município de Marechal Cândido Rondon-PR. Foi utilizada a raça 73 de *C. lindemuthianum*, cedido pela EMBRAPA - CNPAF, Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO (CI 1247-78, CNPAF- Embrapa), o qual era mantido preservado em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967). A multiplicação do fungo foi realizado em placas de Petri, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), e na sequência, essas foram incubadas em câmara BOD, em fotoperíodo de 12 h a 24 °C, por um período de 15 dias (DILDEY et al., 2014).

Os conídios de *C. lindemuthianum* utilizados nas inoculações foram produzidos em tubos de ensaio com o meio ágar-água 1% (previamente fundido em micro-ondas) com cerca de 1/3 da capacidade deste, mais a imersão de uma vagem de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Na sequência os tubos eram vedados e autoclavados a 121 °C por 20 min e, posteriormente, eram colocados em posição inclinada, até a solidificação do meio (FIGUEIRA, 2018). Em condições assépticas, realizava-se a repicagem de *C. lindemuthianum* para os tubos de ensaio, incubando esses por um período médio de 14 dias a 24 °C e fotoperíodo de 12 h, aguardando o recobrimento das vagens com uma mucilagem alaranjada, sinalizando a esporulação, de acordo com Figueira (2018). Os conídios eram retirados com o

auxílio de uma alça de platina, mais a adição de água destilada, realizando-se um esfregaço sob a mucilagem, filtrando a suspensão formada em gaze e finalizando-se com a contagem (em microscópio de luz Olympus CX 31) dos conídios em câmara de Neubauer, aferindo a 1×10^4 conídios mL^{-1} (LUCARINI et al., 2004).

4.2.2 Experimento em Cultivo Protegido

O cultivo das plantas de feijão foi realizado na Estação Experimental de Cultivo Protegido e Controle Biológico Dr. Mário César Lopes ($24^{\circ}33'28''$ latitude sul e $54^{\circ}02'43''$ longitude oeste) da Unioeste, sendo envolta por filme plástico e sombrite no topo, onde a temperatura dia/noite aproximada é de $33/24$ °C, umidade relativa $\geq 70\%$.

O experimento foi realizado em um delineamento experimental em blocos ao acaso, composto de cinco repetições e cinco tratamentos, onde cada vaso representou uma parcela experimental. Os tratamentos foram: T1= água (testemunha), e quelatos metais-aminoácidos de T2= cobre (2 mL L^{-1}), T3= manganês (2 mL L^{-1}), T4= cálcio (3 g L^{-1}) e T5= zinco (3 mL L^{-1}), seguindo a recomendação do fabricante.

O solo utilizado no cultivo das plantas era classificado como LATOSSOLO VERMELHO distroférico profundo, com textura argilosa (SANTOS et al., 2013), sendo este analisado quimicamente, não sendo necessária aplicação de calcário (Tabela 1). O cultivo das plantas se deu em vasos de 3 L contendo mistura de solo, mais areia e matéria orgânica na proporção 2:1:2. Essa mistura foi autoclavada por cerca de 45 min a 120 °C, permanecendo em descanso por sete dias.

Tabela 1. Resultados da análise química do solo para o experimento de feijão conduzido em cultivo protegido em Marechal Cândido Rondon-Pr. UNIOESTE, 2017.

ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO										
P	MO	pH CaCl_2	H+Al	Al $^{3+}$	K+	Ca $^{2+}$	Mg $^{2+}$	SB	CTC	V(%)
Mg dm^3	gm 3	0,01mol L^{-1}	-----cmol $_c$ dm^3 -----							
33,50	19,14	5,69	3,45	0,00	0,52	5,74	3,66	9,92	13,37	73
Micronutrientes										
Cu	Zn		Mn		Fe					
-----Mg dm^3 -----										
7,30	51,00		258,50		30,50					

A variedade de feijão utilizada foi a IPR Tuiuiú do Tipo II, a qual é suscetível a *C. lindemuthianum*, oriundas da Cooperativa de Produtores de sementes de Laranjeiras – Coprossel.

Foram semeadas cinco sementes por vaso a uma profundidade de 3 cm, e após a emergência das plântulas, foram feitos desbastes de forma manual quando as plantas se encontravam no estágio V₂, deixando-se duas plantas por vaso, optando pelas mais vigorosas.

A irrigação foi feita manualmente, cerca de uma a duas vezes ao dia, conforme a necessidade (solo visualmente seco), até que o solo atingisse a capacidade de campo.

As pulverizações dos tratamentos foram realizadas 24 dias após a emergência das plantas (estádio fenológico V₃), sob condições climáticas favoráveis, final da tarde, temperaturas amenas (± 24 °C) e umidade aproximada de 70%, sendo essas realizadas com o auxílio de um borrifador de pressão acumulada, com bico tipo leque.

Para a inoculação, a qual foi realizada três dias após a aplicação dos quelatados metais-aminoácidos, utilizou-se a suspensão dos conídios obtida no laboratório (descrito no item 4.2.1) ajustada para a concentração de 1×10^4 esporos mL⁻¹. Tal operação contou com o auxílio de um borrifador manual (1 borrifada por planta), e na sequência, feito câmara úmida, através do recobrimento das plantas com sacos plásticos transparentes, por um período aproximado de 14 h.

A severidade da doença foi quantificada a cada 72 h, iniciando-se três dias após a inoculação, com auxílio de escala diagramática de severidade da doença proposta por Dalla Pria et al., (2003), totalizando-se oito avaliações.

A partir dos dados obtidos com as avaliações de severidade, realizou-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada tratamento, através de equação proposta por Campbell e Madden apud Paula et al. (2008):

$$\text{AACPD} = \sum [((y_1 + y_2) / 2) * (t_2 - t_1)]$$

Onde y₁ e y₂ são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t₁ e t₂, respectivamente.

A análise estatística foi realizada mediante a comparação entre as médias de AACPD pelo teste de Tukey com $P < 0,05$, através do programa de análise estatística Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2011).

4.2.2.1 Obtenção e Armazenamento das Amostras do Tecido Foliar

As coletas do material vegetal, foram realizadas a partir de plantas de feijoeiro cultivadas no cultivo protegido, descrito no item 4.2.2..

A obtenção do material foi feita de folíolos centrais completamente expandidos, oriundos das plantas de feijoeiro, os quais eram destacados de materiais destrutivos. Após a coleta dos folíolos, eram retiradas rapidamente as nervuras centrais, na sequência esses eram protegidos com papel alumínio e acondicionados a baixas temperaturas em caixa de isopor contendo gelo, seguindo sequencialmente para o congelamento (em freezer a temperaturas inferiores a -16 °C).

No laboratório o material vegetal era macerado e homogeneizado em 4 mL de tampão de acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), mantendo-se a baixas temperaturas, e em seguida realizava-se a centrifugação das amostras a 20.000 *g*/25 min a 4 °C. Os sobrenadantes eram separados do restante do material e armazenava-os em congelador a -20 °C, realizando na sequência as avaliações do teor de proteínas (BRADFORD, 1976) e das atividades enzimáticas.

4.2.2.2 Análises Bioquímicas e Fisiológicas

As amostras de tecido foliar foram coletas em três etapas: Tempo 0, ou seja, no momento da aplicação dos tratamentos; 72 h após a aplicação dos produtos (momento da inoculação de *C. lindemuthianum*), e 144 h após os tratamentos (ou 72 h após a inoculação do patógeno).

4.2.2.2.1 Atividade de peroxidases

A peroxidase foi determinada em espectrofotométrico através do método da conversão do guaiacol em tetraguaiacol (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). As amostras contendo 100 µL do extrato proteico (refrigerado) foram misturadas com 2900 µL de

uma solução, a qual se compunha de 250 μL de guaiacol e 306 μL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0) (a 30 °C). As leituras de absorvância foram em 470 nm durante 2 min, com intervalos de 15 seg.

4.2.2.2.2 Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada pela mensuração da conversão do catecol em quinona (DUANGMAL; APENTEN, 1999). O catecol 20 mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8) foi utilizado como substrato. A reação ocorreu contendo 900 μL do substrato (a 30 °C) mais 100 μL de extrato proteico. As leituras foram feitas a cada 10 seg por 1 min a 420 nm em espectrofotômetro. A diferença entre a terceira e a quinta leitura foram utilizadas para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em unidades de PPO, sendo que uma unidade foi definida como um incremento de absorvância de 0,001 por min de reação por mg de proteína total (DILDEY et al., 2014).

4.2.2.2.3 Atividade de β -1,3- glucanase

Para a avaliação da β -1,3 glucanase foram adicionados 50 μL de tampão fosfato (0,01M pH 6,0), mais 100 μL do extrato proteico e 150 μL de laminarina (200 mg mL⁻¹), incubando-se a 40 °C por 1 h. Na sequência, adicionou-se 4 mL de solução hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico, aquecendo-se a 100 °C por 10 min, com posterior resfriamento em banho de gelo para paralisar a reação. A atividade foi determinada através da dosagem de glicose liberada com a hidrólise da laminarina (TUZUN et al., 1989). As leituras espectrofotométricas foram feitas a 410 nm, e, posteriormente comparadas aos padrões de glicose. A curva padrão para a dosagem de açúcares redutores (glicose) utilizada já havia sido feita anteriormente, a qual seguiu o método de Lever (1972).

4.2.2.2.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Umesha (2006), na qual 50 μL do extrato proteico foram misturado a 450 μL do tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 μL de L-fenilalanina

(50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8), sendo essa mistura incubada por 2 h a 40 °C. A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (controle = 50 µL do extrato proteico + 950 µL de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8).

A atividade da fenilalanina foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato e expressa em µg de ácido trans-cinâmico/min/mg de proteína, utilizando uma curva padrão para o ácido (DILDEY et al., 2014).

4.2.2.3 Análises Estatística

A análise estatística realizada para as atividades enzimáticas, foi realizada análise de variância para cada tempo de coleta (descrição no item 4.2.2.2.), e havendo diferença entre as médias, aplicou-se o teste de Tukey com $P < 0,05$, com o auxílio do programa de análise estatística Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2011).

4.2.3 Experimento de Campo

A experimentação a campo ocorreu em dois locais, sendo o primeiro situado em área experimental de uma empresa particular, localizada no município de Toledo-PR (latitude 24°39'09" sul, longitude 53°50'12" oeste) a 544 m de altitude. O segundo experimento foi conduzido na área experimental da UNIOESTE (Cultivo Protegido e Controle Biológico Dr. Mário César Lopes, latitude 24°33'27" sul, longitude 54°02'40" oeste) a 406 m de altitude, no município de Marechal Cândido Rondon-PR.

As condições climáticas durante os meses de condução dos experimentos de ambos os locais foram coletas, obtendo-se assim os valores das temperaturas mínimas, médias e máxima mensais, bem como da precipitação ocorrida nesse período (Figura 1).

O solo de ambos os locais são classificados como Latossolo Vermelho distroférico profundo, com textura argilosa (SANTOS et al., 2013).

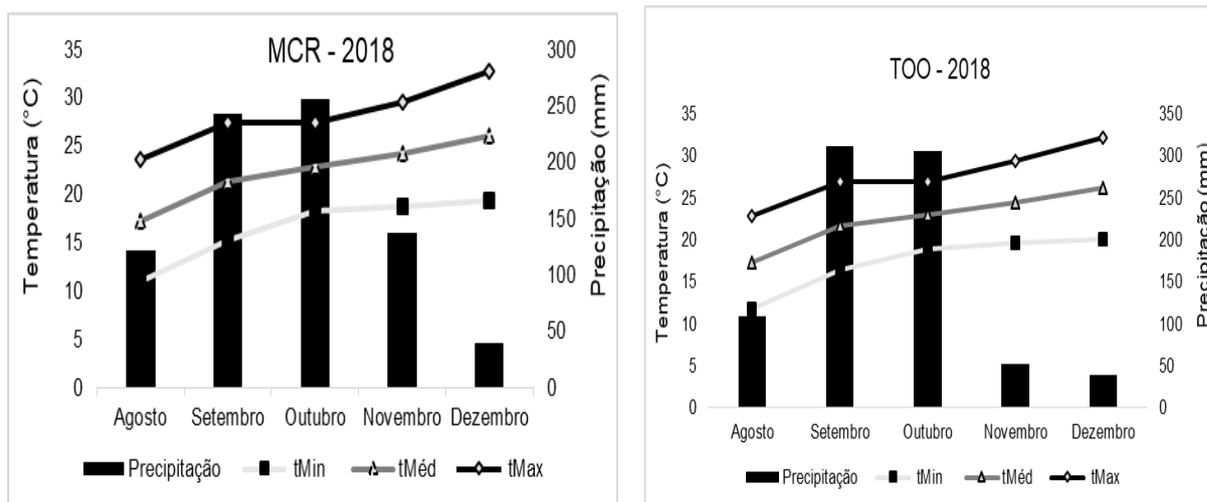


Figura 1. Precipitação (mm), temperatura mínima (tMin), média (tMéd) e máxima (tMax) (°C) dos municípios de Marechal Cândido Rondon (MCR) e Toledo (TOO) – Pr, nos meses de Agosto a Dezembro, período em que realizaram-se dois experimentos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) cultivados em 1ª safra. UNIOESTE, 2018.

Um trimestre antes da semeadura dos experimentos realizaram-se coletas de solo, as quais foram avaliadas quimicamente para os respectivos locais experimentais, não havendo necessidade de aplicação de calagem para ambos os locais (Tabela 2).

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados com quatro repetições e cinco tratamentos: T₁= água (testemunha) e quelatos metais-aminoácidos de T₂= cobre (0,5 mL L⁻¹), T₃= manganês (1 mL L⁻¹), T₄= cálcio (1 g L⁻¹) e T₅= zinco (1 mL L⁻¹), todos seguindo a recomendação do fabricante.

As parcelas experimentais eram compostas de 21 m², com comprimento de 6 m e largura de 3,5 m (sete linhas espaçadas a 0,50 m). A área útil colhida foram duas linhas centrais, com 2 m de comprimento, excluindo-se as bordaduras.

Os experimentos foram implementados no mês de setembro, em sistema de semeadura direta, sendo que as culturas anteriores de ambas era aveia.

A cultivar utilizada foi a IPR Tuiuiú, sendo esta semeada a profundidade de 0,03 m, espaçadas em 0,07 m entre plantas e a 0,50 m entre linhas.

Tabela 2. Resultado da análise química do solo para experimentos com feijão em dois locais na região Oeste do Paraná. UNIOESTE, 2018.

Análise química do solo Toledo-PR											
P	MO	pH _{CaCl₂}	H+Al	Al ³⁺	K+	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	CTC	V(%)	
Mg dm ³	gm ³	0,01mol L ⁻¹	-----cmol _c dm ³ -----								
p1	8,80	23,22	5,30	4,28	0,00	0,63	9,68	2,17	12,48	16,76	75
Micronutrientes											
Cu		Zn		Mn			Fe				
-----Mg dm ³ -----											
2,90		3,90		41,20			28,00				
Análise química do solo Marechal Cândido Rondon-PR											
P	MO	pH _{CaCl₂}	H+Al	Al ³⁺	K+	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	CTC	V(%)	
Mg dm ³	gm ³	0,01mol L ⁻¹	-----cmol _c dm ³ -----								
p1	3,81	19,14	5,32	3,42	0,00	0,42	6,11	3,00	9,53	12,95	74
p2	2,23	9,97	5,10	3,18	0,00	0,22	5,21	3,09	8,52	11,70	73
Micronutrientes											
Cu		Zn		Mn			Fe				
-----Mg dm ³ -----											
p1 14,08		4,10		160,00			32,60				
p2 13,40		10,30		113,00			43,40				

p1= profundidade de 0–20 centímetros, p2= profundidade 21-40 centímetros

O manejo de plantas invasoras foi realizado com campinas regulares quando o feijoeiro se encontrava no estágio fenológico V₂. Os insetos predominantes eram *Diabrotica speciosa*, *Euschistus heros*, *Spodoptera frugiperda* e *Empoasca kraemeri*, os quais foram controlados com os inseticidas Tiametoxam + Lambda-cialotrina na dose de 100 mL ha⁻¹ e acefato na dose de 0,5 kg ha⁻¹, ambos com um volume de calda de 200 L ha⁻¹, sendo esses controles realizados nos estádios fenológicos V₆ e R₅.

Os quelatos metais-aminoácidos foram aplicados em duas ocasiões, 24 dias após a germinação (V₃) e no início do florescimento (R₅), sendo as pulverizações realizadas a 0,2 m acima da cultura, utilizando pulverizador manual de pressão constante, com bico tipo leque e sob condições climáticas favoráveis, final da tarde, temperaturas amenas (± 26 °C), umidade aproximada de 70% e ventos de até 8 km h⁻¹.

A inoculação de *C. lindemuthianum* foi feita 3 dias após a primeira aplicação dos quelatos metais-aminoácidos, aproximadamente 27 dias após a germinação (V₄).

As avaliações da severidade iniciaram no 3º dia após a inoculação, com intervalos de 72 horas, totalizando seis avaliações, mensurada com o auxílio da escala diagramática de severidade da doença (DALLA PRIA et al., 2003).

A partir das médias de severidade da antracnose, realizou-se o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) descritas no item 4.2.2., (CAMPBELL; MADDEN, 1990), e a partir dos dados obtidos da AACPD, referentes aos dois experimentos realizados, esses foram submetidos à uma análise conjunta (FERREIRA, 2011).

4.2.3.1 Análises Agronômicas

As avaliações de campo foram realizadas apenas no experimento do município de Marechal Cândido Rondon, devido a condições climáticas desfavoráveis (Figura 1), sendo feitas após o estágio fenológico R₉ (maturação fisiológica), a campo e no laboratório de agronomia da universidade.

Obtiveram-se as variáveis agronômicas: altura de plantas (ALT), número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos (MCG) e produtividade (PRO).

Os dados foram submetidos a análise de variância (teste F) em nível de 5% de probabilidade de erro, e havendo diferença entre as médias, comparou-se pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa estatístico Sisvar 5.0. (FERREIRA, 2011).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Cultivo Protegido

Com relação ao experimento em cultivo protegido, observou-se que o tratamento quelato metal-aminoácidos de Cu foi o que apresentou menor área abaixo de curva de progresso da doença, diferindo-se estatisticamente do tratamento com Zn, mas no entanto, sem diferença da testemunha (Figura 2).

Segundo pesquisas, altas concentrações de Cu podem reduzir a atividade das enzimas peroxidase e catalase, resultando no acúmulo de peróxidos e

compostos fenólicos, os quais convertem-se em quinonas, sendo essas portadoras de propriedades fungicidas e bactericidas (ZAMBOLIM; VENTURA 1993).

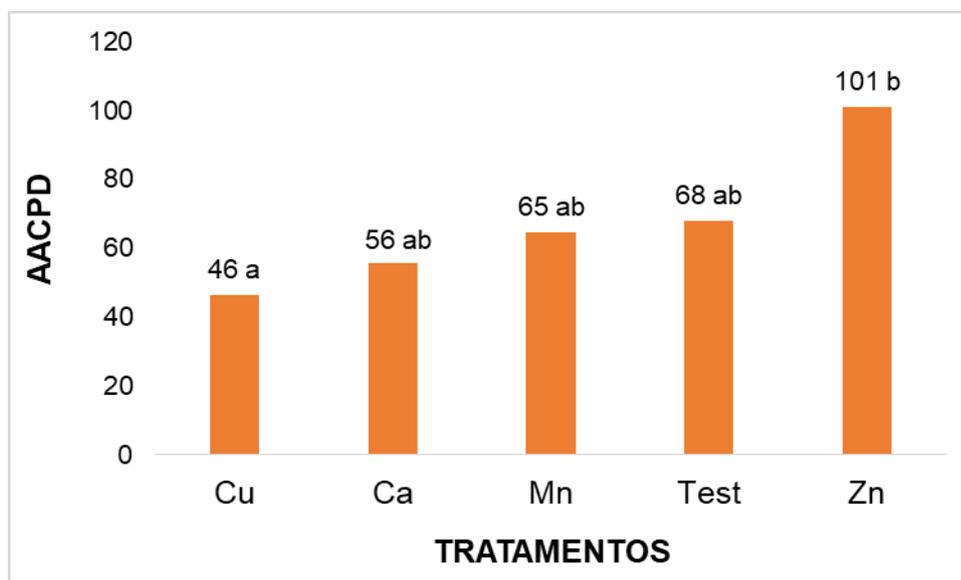


Figura 2. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para a antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, em função da aplicação dos quelatos metais-aminoácidos de cobre (Cu), cálcio (Ca), manganês (Mn) e zinco (Zn), mais a testemunha. A aplicação dos produtos ocorreu no estágio fenológico V₃, 24 dias após a emergência, e as avaliações realizadas com intervalo de 72 horas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com $P < 0,05$, Coeficiente de variação de 35,91%. UNIOESTE, 2017.

Moraes et al. (2009), testando doses de Cu em feijoeiro, observaram decréscimo linear de 35% da área abaixo da curva de progresso da severidade da antracnose (AACPS) com o aumento das doses de cobre, observando a menor AACPS em relação a maior dose utilizada (78 mg L^{-1}).

Nunes (2017), testando calda bordalesa via foliar, constatou redução na severidade de antracnose em feijoeiro no terço superior da planta, para a mesma variedade testada, IPR Tuiuiú, evidenciando que as folhas jovens são capazes de absorver os produtos (íons) de forma mais rápida e eficiente, devido à maior demanda por nutrientes, bem como maior atividade metabólica e menor a espessura da cutícula (TAIZ; ZEIGER, 2008).

Taiz e Zeiger (2008) concluíram que o elemento Cu é um elemento importante na fotossíntese, respiração, desintoxicação de radicais superóxido e na lignificação, sendo esse nutriente indicado como incremento da resistência das plantas a patógenos.

O tratamento quelato metal-aminoácidos de Ca foi o que apresentou a segunda menor média da AACPD, evidenciando o papel fundamental desse elemento na divisão e desenvolvimento celular, na estrutura da parede celular e formação da lamela média. Alguns fungos dissolvem essas estruturas quando alcançam o tecido da planta (através da produção de enzimas pectolíticas extracelulares), todavia, fornecendo-se Ca, pesquisas comprovam que as atividades dessas enzimas são drasticamente inibidas (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993). Nascimento et al. (2017), testando a influência do Ca e do Si em feijão-fava sob cultivo protegido, na severidade de *Colletotrichum truncatum*, concluíram que houve redução da antracnose de 66,37% e 75,34%, respectivamente.

O efeito do Mn mais comumente verificado quando é fornecido via pulverizações foliares seria como participante de diversos processos biológicos como na absorção iônica, fotossíntese, respiração, regulação hormonal, síntese de proteínas e proteção a entrada de patógenos (MALAVOLTA et al., 1997). Gotijo Neto et al. (2016), avaliando a influência de indutores de resistência no controle de antracnose em feijoeiro, concluíram que sulfato de Mn e fosfito de Mn, aplicados via foliares, ocasionaram redução de 10,3% na área abaixo da curva de progressão da severidade (AACPS), em relação à testemunha. Gadaga et al. (2017) testando fosfitos no controle da antracnose no feijoeiro, concluíram que o fosfito de Mn, juntamente com o de K, foram os que apresentaram a menor AACPD, com valores que variaram entre 74% e 81%, em comparação ao controle.

Com relação ao tratamento Zn, observou-se que esse apresentou a maior média da AACPD, superior a testemunha, evidenciando que além de não ser eficiente no controle de *C. lindemuthianum*, este predispõe as plantas a doença (Figura 1). Alguns estudos comprovam que o Zn aparece sendo essencial no processo de crescimento, esporulação e virulência de alguns patógenos específicos (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993). Araújo et al. (2000) contataram que, ao utilizar a calda Viçosa via pulverização foliar, sem o elemento Zn, a severidade de mancha angular no feijoeiro foi reduzida. Contrapondo isso, Gadaga et al. (2017), avaliando o efeito de fosfitos na proteção do feijoeiro contra antracnose, concluíram que o fosfito de Zn, juntamente com o de K e o K + ácido salicílico, foram eficazes no controle da doença.

Analisando os resultados das enzimas relacionadas a defesa vegetal, observa-se que houve a ativação significativa da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) 72 h após a aplicação dos quelatos aminoácidos-metais, obtendo um aumento expressivo do ácido trans-cinâmico no tratamento Ca, o qual diferiu estatisticamente de Zn (Figura 3).

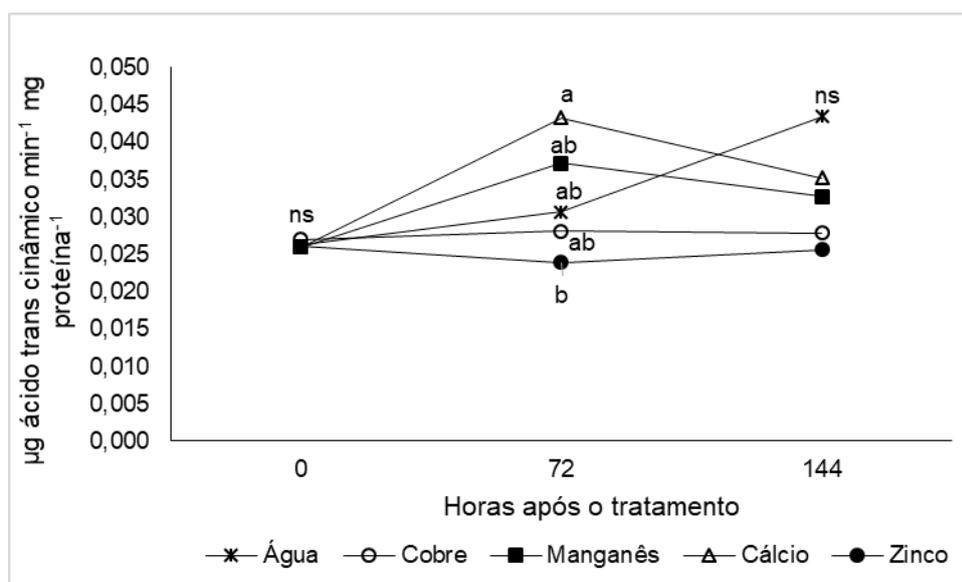


Figura 3. Atividade de fenilalanina amônia-liase na cultivar IPR Tuiuí de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados aminoácidos metais de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação do fungo *C. lindemuthianum* (na concentração de $2,25 \times 10^6$ esporos mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com $P < 0,05$. N.S.: não significativo.

Outro comportamento importante da enzima foi que, após 72 h da inoculação de *C. lindemuthianum*, apenas a testemunha continuou a elevar os valores da FAL, evidenciando que os quelatos aminoácidos-metais testados induziram a resistência das plantas de feijão (Figura 3).

Para a atividade da polifenoloxidase observou um comportamento divergente para o quelato metal-aminoácidos de Mn, que além de diferenciar estatisticamente da testemunha, esse apresentou um aumento da atividade enzimática 72 h após a aplicação do produto, seguido de queda após a inoculação de *C. lindemuthianum*, contrapondo o comportamento dos demais tratamentos (Figura 4). Há bastante tempo discute-se o envolvimento do Mn no controle de patógenos em plantas, Zambolim e Ventura (1993) já discorriam que as concentrações de Mn eram

alteradas nas plantas infectadas por fitopatógenos, sendo a magnitude do elemento influenciada pela planta hospedeira ou cultivar, e órgão infectado. Contrária a essas informações observou-se nesse estudo que houve um gasto energético, ou ativação enzimática após o fornecimento do micronutriente e em contrapartida, a diminuição da polifenoloxidase 72 h após a inoculação de *C. lindemuthianum*.

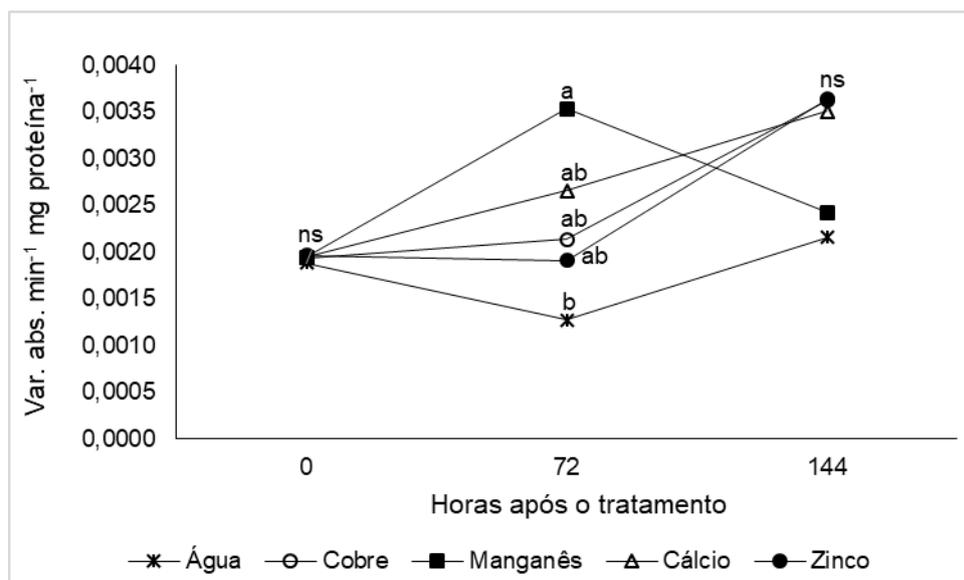


Figura 4. Atividade de polifenoloxidase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados aminoácidos metais de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação do fungo *C. lindemuthianum* (na concentração de $2,25 \times 10^6$ esporos mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com $P < 0,05$. N.S.: não significativo.

Com relação a peroxidase, observou-se que os valores da atividade enzimática para os quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn e a testemunha em feijoeiro não foram significativos (Figura 5).

Campos et al. (2004), avaliando a influência da enzima peroxidase na resistência a antracnose em diferentes cultivares de feijoeiro, observaram que para algumas cultivares não houve alterações significativas da enzima, concluindo que os maiores estímulos nas atividades enzimáticas foram verificados em cultivares com maior resistência a doença.

Visto que a cultivar utilizada nesse estudo (IPR Tuiuiú) é altamente suscetível a doença, correlacionam-se aos resultados encontrados pelos autores, em função da não significância da peroxidase (Figura 5).

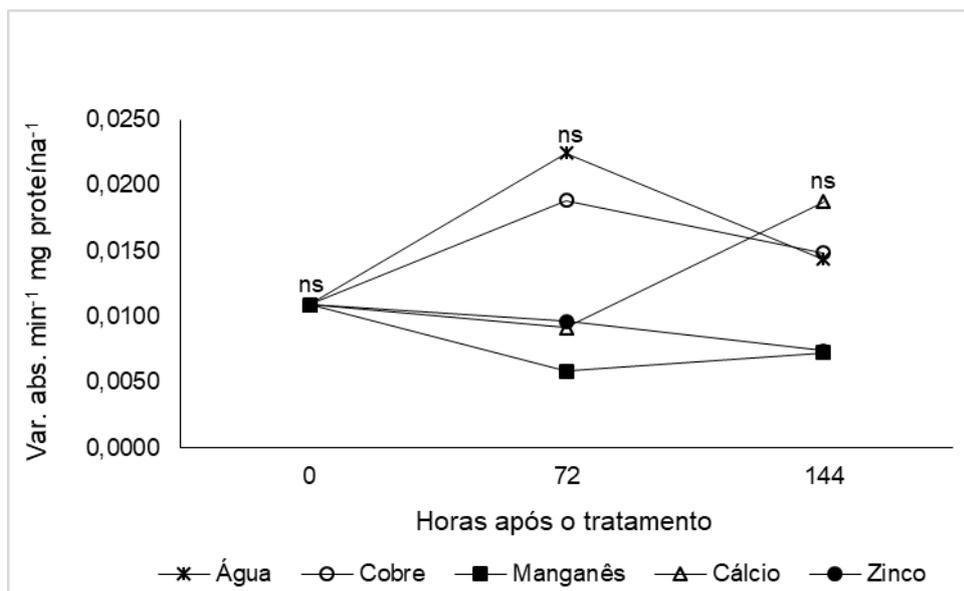


Figura 5. Atividade de peroxidase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados aminoácidos metais de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação do fungo *C. lindemuthianum* (na concentração de $2,25 \times 10^6$ esporos mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com $P < 0,05$. N.S.: não significativo.

Na Figura 6 observa-se que a atividade de β -1,3 glucanase sofreu alterações 72 h após o tratamento do quelato metal-aminoácidos de Mn, o qual elevou bruscamente a atividade enzimática, diferindo dos demais produtos, com posterior diminuição, após a inoculação de *C. lindemuthianum* (Figura 5).

Semelhantemente, Bruzamarello et al. (2018), analisando o efeito de produtos à base de fosfitos na indução de resistência sistêmica adquirida em soja, verificaram que houve alteração na enzima β -1,3 glucanase 48 hr após a aplicação do fosfito de Mn, com posterior queda, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, dentre eles o fosfito de Cu.

Ressalva-se que o produto testado exerceu além do fornecimento do micronutriente, a liberação da enzima responsável pela degradação da glucana, a qual localiza-se na parede celular do patógeno, exercendo um papel importante na severidade a doença, evidenciado na Figura 2.

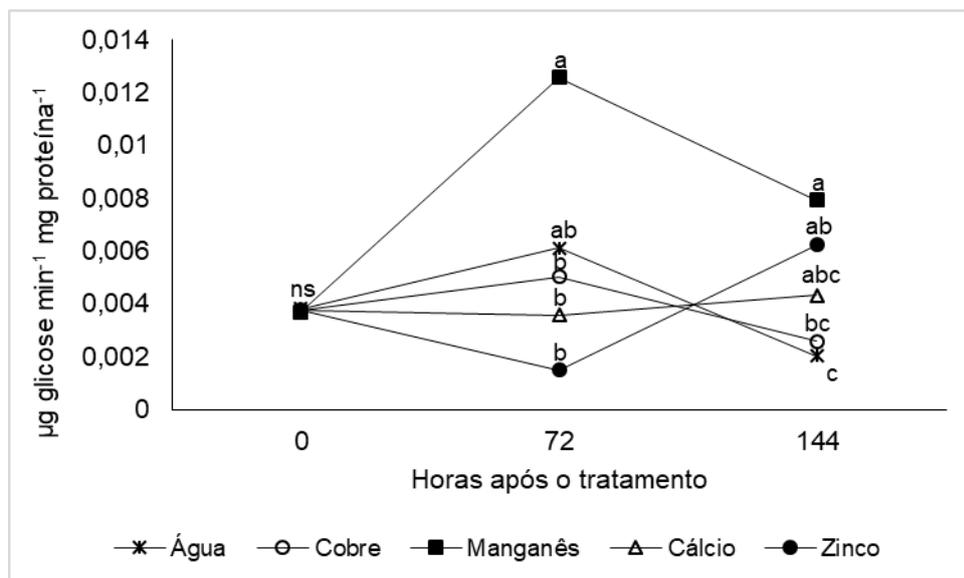


Figura 6. Atividade de β -1,3 glucanase na cultivar IPR Tuiuiú de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), iniciando-se no estágio V₃, no momento da aplicação (tempo zero) dos produtos quelatados aminoácidos metais de Cu, Mn, Ca e Zn (dose seguindo a recomendação do fabricante) e a testemunha (água). A inoculação do fungo *C. lindemuthianum* (na concentração de $2,25 \times 10^6$ esporos mL⁻¹) ocorreu 72 horas após os tratamentos. Dentro do mesmo tempo, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com $P < 0,05$. N.S.: não significativo.

4.3.2 Resultados de Campo

Ao analisar a severidade de antracnose nos dois locais de cultivo do feijoeiro, notou-se que ambos apresentaram médias de AACPD bem divergentes, sendo significativamente diferentes (Figura 7). Quando compara-se os municípios, Marechal Cândido Rondon mostrou-se mais favorável ao desenvolvimento do *C. lindemuthianum* em primeira safra, e sobre pulverização dos quelatos metais-aminoácidos não houve diferença entre as médias de AACPD analisadas (Figura 7).

No município de Toledo, as médias de AACPD da antracnose em feijoeiro (1ª safra), não diferiram estatisticamente entre si, sendo que os quelatos aminoácidos-metais de Cu, Mn, Ca e Zn foram semelhantes a testemunha, apresentando alterações na severidade da doença, no entanto, não significativas (Figura 7). Harms (2016) e Truylio (2015) também não observaram efeito positivo de fertilizantes foliares (Ca – 1,31% e Mn – 2,5%, Zn – 1,9%, Ca – 4,6%, Cu – 26 mg Kg⁻¹, respectivamente) no controle da antracnose em feijoeiro sob condições de campo.

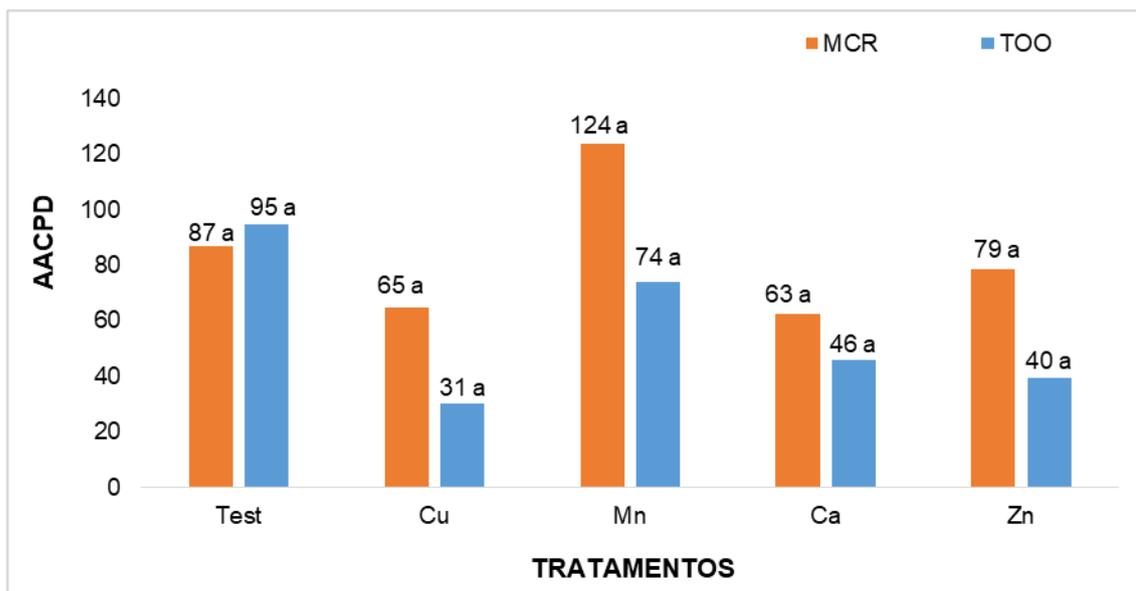


Figura 7. Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) para a antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) 1ª safra, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* nos municípios de Marechal Cândido Rondon e Toledo - PR, em função da aplicação dos quelatos metais-aminoácidos de cobre (Cu), manganês (Mn), cálcio (Ca) e zinco (Zn) mais a testemunha. As aplicações dos produtos foram efetuadas nos estádios fenológicos V₃ e R₅, sendo as avaliações realizadas com intervalo de 5 dias. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey com P < 0,05, Coeficiente de variação de 47,55%. UNIOESTE, 2018.

Gurgel et al. (2017), testando indutores de resistência no controle da antracnose (*C. gloeosporioides*) em bastão do imperador (*Etilingera elatior*) a campo, dentre esses o Crop-Set®, o qual é composto de um conjunto de extratos vegetais enriquecidos com minerais complexados por aminoácidos, concluíram que estatisticamente não houve diferença entre os indutores testados, todavia, havendo uma redução na severidade da doença de 21,4%, com o pulverização do fertilizante foliar.

Para que ocorra a infecção, colonização e a reprodução do patógeno na planta hospedeira, são necessárias primordialmente condições favoráveis a esses eventos, como temperatura, umidade relativa, molhamento foliar, luz e estado nutricional, que estejam condizentes as requeridas pelo microrganismo infectante (AMORIM; PASCHOLATI, 2018). Sabe-se que a campo essas condições abióticas oscilam bastante, especialmente de acordo com a estação em que se encontram. Dentro desse pensamento, o cultivo de primeira safra do feijoeiro na região Sul estão presentes temperaturas mais elevadas, desfavorecendo *C. lindemuthianum*, especulando-se que, as baixas médias de severidade, sejam em função de condições climáticas desfavoráveis ao patógeno (Figura 7).

As variáveis agronômicas não foram influenciadas pelo fornecimento dos quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn, sendo esses semelhantes a testemunha (Tabela 3).

As condições climáticas (Figura 1), especialmente a precipitação, podem ter influenciado negativamente nas variáveis agronômicas, uma vez que os índices pluviométricos foram acima dos requeridos pela cultura, ocasionando um desenvolvimento vegetativo excessivo. Somado ao fato do suprimento nutritivo com os fertilizantes foliares, supõe-se que, a produtividade tenha sido influenciada (Tabela 3).

Resultados similares foram obtidos por Harms (2016) que, verificando a eficácia de produtos alternativos no controle da antracnose em feijoeiro, dentre eles um fertilizante foliar (com 1,31% de Ca em sua composição), não observou diferença significativa nas variáveis número de vagens por planta, número de grãos por vagem, nem no peso de mil grãos.

Tabela 3. Altura de plantas (ALT), número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos (MCG) e produtividade (PRO) em função da aplicação de quelatos metais-aminoácido de cobre, manganês, cálcio e zinco, mais a testemunha, no município de Marechal Cândido Rondon Paraná. 2018.

Tratamentos	ALT (m)	NVP	NGV	MCG (g)	PRO (sc ha ⁻¹)
Testemunha	0,79 A	20,59 A	5,89 A	23,85 A	135,21 A
Cu	0,81 A	18,16 A	6,58 A	24,33 A	136,81 A
Mn	0,74 A	22,08 A	6,83 A	22,73 A	155,64 A
Ca	0,76 A	15,58 A	6,34 A	22,57 A	104,07 A
Zn	0,80 A	18,45 A	6,34 A	22,67 A	126,23 A
Médias	0,78	18,97	6,40	23,23	131,59
CV (%)	13,69	20,24	9,86	6,34	23,82
DMS	0,23	8,65	1,42	3,32	70,65

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade de erro.

Semelhantemente, Rocha et al. (2015), avaliando o desempenho do feijoeiro em função do fornecimento de um biofertilizante, o qual continha em sua composição Cu, Mn, Ca e Zn, não observaram diferença estatística nas variáveis número de vagens por planta, nem tão pouco número de grãos por planta.

É importante ressaltar que as condições bióticas e abióticas (Figura 1) presentes podem interferir significativamente nas variáveis agrônômicas de uma cultura a elas expostas, e que, além desses fatores, outros componentes podem interferir como o manejo, a composição genética do cultivar, bem como a dose utilizada dos insumos empregados.

Foi observado que, a partir do fornecimento da dose recomendada do quelato metal-aminoácido de Zn para o cultivo de feijoeiro, as plantas apresentaram fitotoxidez nas folhas em forma de clorose, especulando-se o fato de esta estar acima do requerido e/ou absorvido pelo feijoeiro.

Dentro desse raciocínio, Dorneles et al. (2017), avaliando o efeito de doses crescentes de Zn, sobre parâmetros bioquímicos e de crescimento do feijoeiro comum, concluíram que plantas de feijão são sensíveis ao excesso de Zn, e que, concentrações acima de 2 μM são suficientes para causar danos, como prejuízos no crescimento, e ainda, afetar as atividades de enzimas do sistema antioxidante nas plantas.

Por outro lado, Estevez (2018) encontrou informações divergentes quando testava diferentes doses do produto Fert Protetor[®] (a base de sulfato de cálcio), no controle do fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) em feijoeiro, constatando uma redução no índice de severidade da doença de até 90%, bem como um aumento nas variáveis número de vagens por planta, massa de mil grãos e conseqüentemente, um incremento na produtividade da cultura em resposta à aplicação do produto.

4.4 CONCLUSÕES

Conclui-se que o tratamento quelato metal-aminoácidos de Cu reduziu a severidade da antracnose do feijoeiro na cultivar IPR Tuiuiú em cultivo protegido, enquanto que o tratamento quelato metal-aminoácidos de Zn induziu a maior porcentagem da doença, resultando na maior AACPD.

A enzima fenilalanina amônia-liase foi ativada pelo quelato metal-aminoácidos de Ca, enquanto as enzimas polifenoloxidase e β -1,3 glucanase foram influenciadas pelo quelato metal-aminoácidos de Mn, 72 h após a pulverização.

O município de Toledo-PR apresentou as menores médias de AACPD da antracnose, sem diferença significativa entre os tratamentos testados, todavia, os quelatos metais-aminoácidos de Cu e Ca apresentaram as menores médias da doença.

As variáveis agronômicas não foram influenciados pelo fornecimento dos quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn.

REFERÊNCIAS

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de Relações Patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. Ouro Fino: Ceres, 2018, cap. 4, p. 45-67.

ARAÚJO, G.A.A.; ZAMBOLIM, L.; SANTOS, G.P.; PEREIRA, P.R.G. Controle da mancha- Controle da mancha-angular (*Phaeoisariopsis griseola*) do feijoeiro com a calda Viçosa. **Acta Scientiarum**, v.22, n.4, p.973-977, 2000.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.

BRADFORD, 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, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRUZAMARELLO, J.; FRANCESCHI, V. T.; DALACOSTA, N. L.; GONÇALVES, I.; MAZARO, S. M.; REIS, E. Potencial de fosfitos na indução da resistência em plantas de soja. **Cultura Agrônômica**, v. 27, n. 3, p. 263-273, 2018.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York. John Wiley & Sons, 1990.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CANTERI, M. G.; PRIA, M. D.; SILVA, O. C. **Principais doenças fúngicas para manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEPG, 1999.

CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

COHEN, Y. Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids. **Phytopathology**, n. 84, n. 1, p. 55-59, 1994.

DALLA PRIA, M. AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de Componentes Monocíclicos da Antracnose do Feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira** v. 28, n.4, p. 401-407, 2003.

DILDEY, O. D. F.; BARBIAN, J. M.; GONÇALVES, E. D. V.; BROETTO, L.; ETHUR. L. Z.; KUHN, O. J.; BONETT, L. P. Inibição do crescimento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, p. 132-136, 2014.

DORNELES, A. O. S.; PEREIRA, A. S.; MENEGATTI, R. D.; OLIVEIRA, L. O.; DUTRA, D. B.; DEUNER, S. Plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivadas sob concentrações crescentes de zinco. **Revista Científica Rural-Urcamp**, v. 19, n. 1, p. 26-31, 2017.

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, n. 3, p. 351-359, 1999.

ESTEVEZ, R. L. **Efeito protetivo de um produto comercial a base de sulfato de cálcio (Fert protetor®) em cafeeiro, eucalipto e feijoeiro**. 2018. 57 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2018.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema de análise estatística computacional. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIRA, E. P. P. **Alterações fisiológicas, anatômicas e produtivas do feijoeiro induzidas por *Trichoderma* spp. e fosfato de Potássio em resposta ao ataque de *Colletotrichum lindemuthianum***. 2018. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2018.

GADAGA, S. J. C.; DE ABREU, M. S.; DE RESENDE, M. L. V.; JÚNIOR, P. M. R. Fosfitos para o controle da antracnose em feijoeiro comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 1, p. 36-44, 2017.

GALBIATTI, J. A.; SILVA, F. G.; FRANCO, C. F.; CARMELLO, A. D.; Desenvolvimento do feijoeiro sob o uso de biofertilizante e adubação mineral. **Engenharia Agrícola**, v. 31, n. 1, p. 167-177, 2011.

GONTIJO NETO, G. F.; ANDRADE, M. J. B.; POZZA, E. A.; MARTINS, F. A. D.; SOARES, B. L.; BELAN, L. L.; CARDILHO, B. E. da. S. Controle da Antracnose e da Mancha Angular do Feijoeiro Comum com Indutores de Resistência. **Nucleus**, v. 13, n. 2, p. 199-208, 2016.

GURGEL, L. M. S.; COELHO, R. S. B.; OLIVEIRA, S. M. A.; SILVA, R. L. X.; ROSA, R. C. T.; ASSIS, T. C.; ANDRADE, D. E. G. T. Efeito de indutores de resistência no controle da antracnose do bastão do imperador (*Etlíngera elatior*). **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.13/14, p.223-233, 2017.

HARMS, M. G. **Controle da Antracnose em feijão com produtos alternativos**. 2016. 75 f. Tese (Doutorado em Agricultura) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 273-279, 1972.

LUCARINI, A.C.; SILVA, L.A.; BIANCHI, R.A.C. Um sistema para a contagem semi-automática de microrganismos. **Pesquisa e Tecnologia**, n. 26, p. 36-40, 2004.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, v. 25, n. 3, p. 244-249, 1999.

MALAVOLTA, E; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997.

MORAES, S. R. G.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; CARVALHO, J. G.; SOUZA, P. E. Nutrição do feijoeiro e intensidade da antracnose em função da aplicação de silício e cobre, **Acta Scientiarum, Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 283-291, 2009.

NASCIMENTO, A. D.; FEIJÓ, F. M.; ALBUQUERQUE, A. W.; ASSUNÇÃO, I. P.; DE ANDRADE LIMA, G. S.; REIS, L. S. Severidade da antracnose do feijão-fava afetada por doses de Cálcio e fontes de Silício. **Revista Ciência Agrícola**, v. 15, n. 2, p. 61-68, 2017.

NUNES, J. A. **Uso de produtos alternativos à base de silício e cobre, em comparação ao fungicida na redução da severidade de doenças e sob aspectos de rendimento do feijoeiro**. 2017. 46 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2017.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2018, cap. 35, p. 424-449.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S.; A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

ROCHA, D. P.; BRITO, M. F.; SANTOS, L. C.; SOUZA, R. L.; GALLO, A. S.; SILVA, R. F. Desempenho do feijoeiro sob o uso de fertilizante em sistema orgânico de produção. **Acta Iguazu**, v. 4, n. 2, p. 97-109, 2015.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2013.

STONE, L. F.; FERREIRA, E. P. B.; DIDONET, A. D.; HEINEMANN, A. B.; OLIVEIRA, J. P. Correlação entre a produtividade do feijoeiro no sistema de produção orgânica e atributos do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 1, p. 19–25, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TARSITANO, M. A. A.; SANT'ANA, A. L.; TARSITANO, R. A. Aspectos sociais e econômicos da produção de feijão. In: ARF, O.; LEMOS, L. B.; SORATTO, R. P.; FERRARI, S. **Aspectos gerais da cultura do feijão *Phaseolus vulgaris* L.** Botucatu: Editora FEPAF, 2015.

TRUYLIO, C. E. C. **Efeito de produtos alternativos para o controle da antracnose em feijão**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

TUZUN, S.; RAO, M. N.; VOLGELI, U.; SCHRADE, C. L.; KUC, J. Induced systemic resistance to blue mold: early induction and accumulation of β 1,3-glucanases, chitinases, and other pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized tobacco. **Phytopathology**, v. 79, n. 9, p. 979, 1989.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. Z. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 275-318, 1993.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os quelatos metais-aminoácidos foram eficientes no controle *in vitro* com uma redução na germinação de conídios superior a 90% de *C. lindemuthianum*, bem como, na diminuição de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* formadas.

As médias de AACPD foram influenciadas pelos quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn, apresentando esses, potencial no controle do cretamento bacteriano comum e antracnose em feijoeiro.

As enzimas de defesa polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, peroxidase e β -1,3 glucanase foram ativadas 72 horas após o fornecimento dos quelatos metais-aminoácidos de Cu, Mn, Ca e Zn, reduzindo suas atividades após a inoculação dos patógenos, evidenciando a diminuição do gasto energético no controle das doenças.

As variáveis agronômicas não sofreram alterações eminentes em função dos quelatos metais-aminoácidos de Cu, Ca e Zn, sendo que, apenas o tratamento Mn promoveu aumento no número de vagens por planta e produtividade no município de Toledo-PR.

ANEXOS

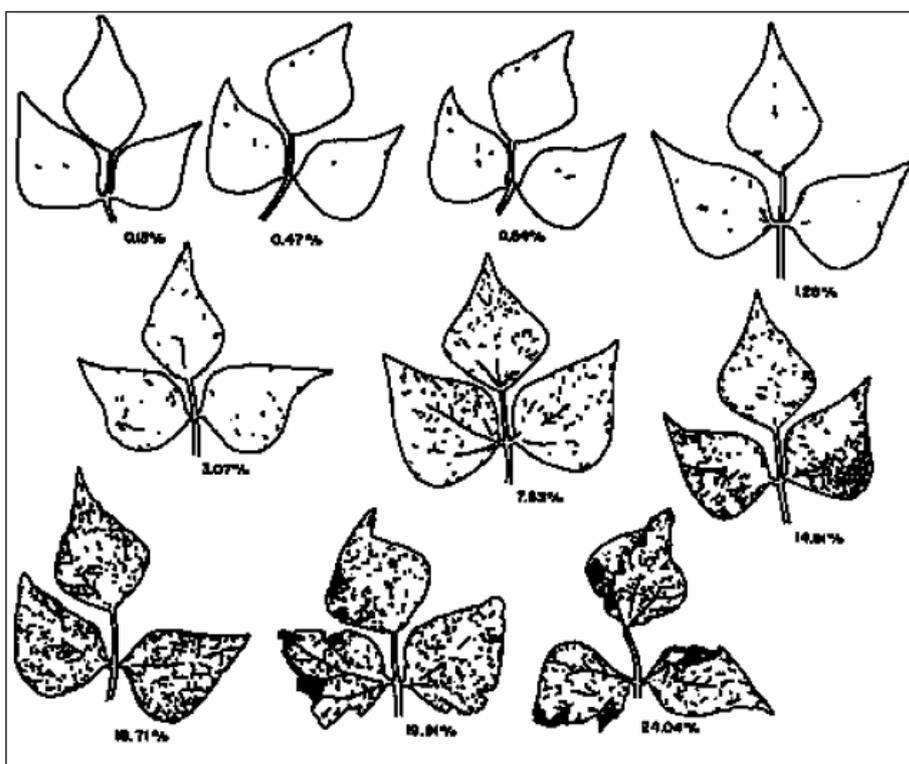


Figura 1. Escala diagramática para a antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria, Amorim e Canteri (1999).

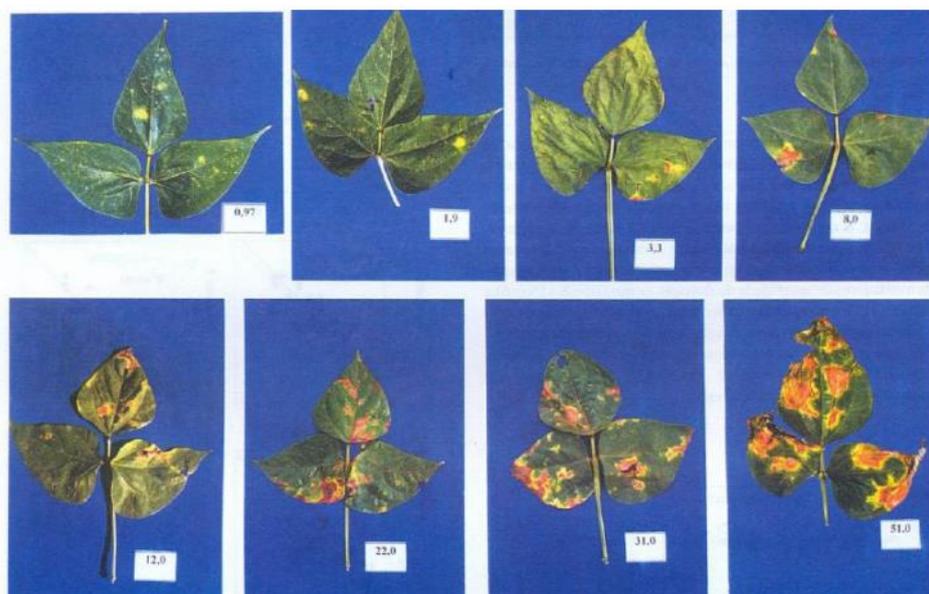


Figura 2. Escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. Fonte: Dias, Bassanezi e Bergamin Filho (2001).