

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL DOUTORADO

CLAIR APARECIDA VIECELLI

**FORMULAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICO PARA
CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS NO FEIJOEIRO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON, PARANÁ
2012

CLAIR APARECIDA VIECELLI

**FORMULAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICO PARA
CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS NO FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado, para obtenção do título de Doutora.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ
RENATO STANGARLIN

MARECHAL CÂNDIDO RONDON, PARANÁ

2012



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.



Estado do Paraná

Ata da reunião da Comissão Julgadora da defesa de Tese da Bióloga **CLAIR APARECIDA VIECELLI**. Aos vinte e oito dias do mês de maio de 2012, às 14h00min, sob a presidência do Prof. Dr. José Renato Stangarlin em sessão pública reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa da Tese da Bióloga Clair Aparecida Viecelli, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia – Nível Doutorado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"DOUTOR EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof. Dr. Roberto Luis Portz (UFPR), Prof.^a Dr.^a Vivian Carré Missio (UFPR), e Prof. Dr. Odair José Kuhn, Prof. Dr. Affonso Celso Gonçalves Júnior e Prof. Dr. José Renato Stangarlin (Orientador).

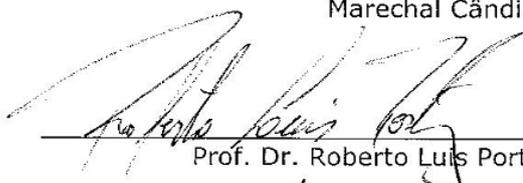
Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Tese, intitulada: **"FORMULAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICO PARA CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS NO FEIJOEIRO"**.

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof. Dr. Roberto Luis Portz.....Aprovada
Prof.^a Dr.^a Vivian Carré Missio.....Aprovada
Prof. Dr. Odair José Kuhn.....Aprovada
Prof. Dr. Affonso Celso Gonçalves Júnior.....Aprovada
Prof. Dr. José Renato Stangarlin (Orientador).....Aprovada

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"DOUTOR EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 28 de maio de 2012.



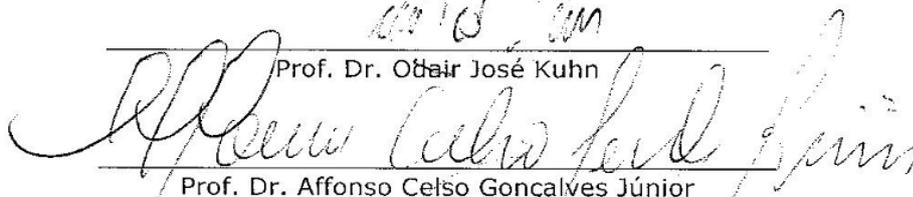
Prof. Dr. Roberto Luis Portz



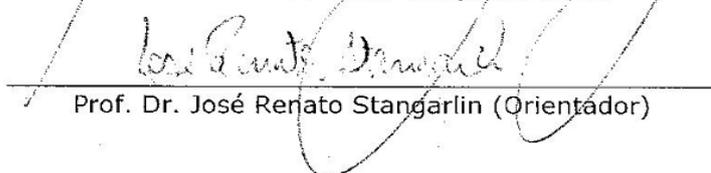
Prof.^a Dr.^a Vivian Carré Missio



Prof. Dr. Odair José Kuhn



Prof. Dr. Affonso Celso Gonçalves Júnior



Prof. Dr. José Renato Stangarlin (Orientador)

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

V656f	Viecelli, Clair Aparecida Formulação de extratos vegetais e fúngico para controle alternativo de doenças no feijoeiro / Clair Aparecida Viecelli. - Marechal Cândido Rondon, 2012. 150 p. Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2012. 1. Feijão - Cultura. 2. Feijoeiro - Doenças fúngicas. 3. Feijoeiro - Doenças bacterianas. 4. Feijoeiro - Controle de doenças - Extrato seco de alecrim. 5. Feijoeiro - Controle de doenças - Extrato seco de cúrcuma. 6. Feijoeiro - Controle de doenças - Extrato seco de <i>P. sanguineus</i> . I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título. CDD 22.ed. 635.652 635.65794 CIP-NBR 12899
-------	--

Ficha catalográfica elaborado por Marcia Elisa Sbaraini-Leitzke CRB-9/539

A Deus Pai e a Jesus Cristo,
que nos abençoou com a vida e com o equilíbrio de sua perfeita criação

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu alicerce, pela benção recebida.

A Nossa Senhora Aparecida, pela sua intercessão.

A minha mãe (*in memoriam*), que nos momentos difíceis senti sua presença mais perto de mim como nunca. Ao meu pai e meus irmãos pelo exemplo da persistência.

Ao meu marido Nelson, que foi compreensivo e sempre acreditou em mim.

Ao pequeno Pedro Henrique, meu maior presente de Deus.

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin pela valiosa orientação para a conclusão deste trabalho, por ser exemplo de profissional ético e organizado, e acima de tudo, pela responsabilidade de ser a base das pesquisas nacionais e internacionais em controle alternativo, gerando conhecimento crítico e formação de profissionais conscientes.

Ao prof. Dr. Odair José Kuhn, pelos valiosos comentários e opiniões, importantes para o desenvolvimento deste projeto.

Ao corpo docente da pós-graduação da Unioeste, por formarem o alicerce forte capaz de sustentar os profissionais que emergem do programa.

Aos professores da FAG, Cláudia, Geovani, Ana Paula, Glaucia, Bianca, Reginaldo, Laércio, Vivian, Viviana, Camila, Maria Izabel, Greyci e Renato pelo coleguismo e troca de experiências de grande valor.

Aos professores da PUCPR Toledo, Daga, Aline, Edson, Paulo, Marcia, Micheli, Luciano, Ciro, Gert, Elisiane, Simoni e Luciana, pelo companheirismo.

Aos amigos, Ariane, Gracy, Dilamar, Wal, Claudinha, Samara, Fran, Paula, Nicanor, Natália, Mariana, Jéssica, Camila, Paola, Cristiane e Mari pela força.

Aos meus alunos, que com desafios ou brincadeiras, inseguranças ou certezas, impulsionaram a me qualificar cada vez mais para responder os questionamentos a altura de suas dúvidas e respaldar seus interesses.

A Unioeste, pelo programa de pós-graduação, por disponibilizar a estrutura e material necessário para a conclusão da pesquisa.

A FAG, por disponibilizar a casa de vegetação e a área a campo para o desenvolvimento do trabalho.

A todos que, com apoio ou crítica, interferiram diretamente no desenvolvimento desse trabalho e auxiliaram a sua conclusão.

Muito Obrigada...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO.....	22
2.2 DOENÇAS DO FEIJOEIRO	23
2.2.1 MANCHA ANGULAR - <i>Pseudocercospora griseola</i>	23
2.2.1.1 SINTOMAS.....	23
2.2.1.2 ETIOLOGIA.....	24
2.2.1.3 CONTROLE.....	24
2.2.2 CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM – <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	25
2.2.2.1 SINTOMAS.....	25
2.2.2.2 ETIOLOGIA.....	25
2.2.2.3 CONTROLE.....	26
2.3 CONTROLE DE DOENÇAS.....	26
2.3.1 CONTROLE QUÍMICO DE DOENÇAS	27
2.3.2 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS	27
2.3.2.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	28
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
4 CAPÍTULO I - FORMULAÇÃO DE EXTRATO DE ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i>) PARA O CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM FEIJOEIRO...37	
RESUMO.....	38
ABSTRACT	39
4.1 INTRODUÇÃO	38
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.2.1 Obtenção e manutenção de <i>P. griseola</i>	41
4.2.2 Obtenção e manutenção de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	41
4.2.3 Formulação e determinação da validade do extrato de <i>R. officinalis</i>	42

4.2.4 Testes <i>in vitro</i> para determinação da validade do extrato de <i>R. officinalis</i>	43
4.2.4.1 Inibição da germinação de esporos.....	43
4.2.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana.....	43
4.2.5 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de <i>R. officinalis</i>	44
4.2.5.1 Cultivo em casa de vegetação	44
4.2.5.2 Aplicação dos extratos com estabilidade acelerada.....	44
4.2.5.3 Inoculação de <i>P. griseola</i> em casa de vegetação	44
4.2.5.4 Inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em casa de vegetação	45
4.2.5.5 Avaliação da severidade para determinação da validade	45
4.2.6 Testes <i>in vitro</i> para determinação da eficiência do extrato de <i>R. officinalis</i> ...	45
4.2.6.1 Inibição da germinação de esporos.....	45
4.2.6.2 Inibição da multiplicação bacteriana.....	46
4.2.7 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de <i>R. officinalis</i>	46
4.2.7.1 Cultivo em casa de vegetação	46
4.2.7.2 Aplicação dos tratamentos em casa de vegetação	47
4.2.7.3 Inoculação de <i>P. griseola</i> em casa de vegetação	47
4.2.7.4 Inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em casa de vegetação	47
4.2.7.5 Avaliação da severidade para determinação da eficiência.....	47
4.2.8 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro em casa de vegetação ...	47
4.2.8.1 Avaliação de crescimento de parte aérea e raiz.....	48
4.2.9 Testes a campo para determinação da eficiência do extrato de <i>R. officinalis</i>	48
4.2.9.1 Cultivo a campo.....	48
4.2.9.2 Aplicação dos tratamentos a campo	49
4.2.9.3 Avaliação da severidade a campo.....	49
4.2.9.4 Avaliação da produtividade a campo.....	49
4.2.10 Análise estatística	50
4.2.10.1 Análise estatística dos testes para determinação da validade	50
4.2.10.2 Análise estatística dos testes para determinação da eficiência.....	51
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.3.1 Determinação da validade do extrato de <i>R. officinalis</i>	51
4.3.2 Testes <i>in vitro</i> para determinação da validade do extrato de <i>R. officinalis</i>	51
4.3.2.1 Inibição da germinação de esporos.....	51

4.3.2.2 Inibição da multiplicação bacteriana.....	52
4.3.3 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de <i>R. officinalis</i>	53
4.3.3.1 Avaliação da severidade de <i>P. griseola</i>	53
4.3.3.2 Avaliação da severidade de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	54
4.3.4 Testes <i>in vitro</i> para determinação da eficiência do extrato de <i>R. officinalis</i> ...	55
4.3.4.1 Inibição da germinação de esporos.....	55
4.3.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana.....	57
4.3.5 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de <i>R. officinalis</i>	58
4.3.5.1 Avaliação da severidade de <i>P. griseola</i> para determinação da eficiência ...	59
4.3.5.2 Avaliação da severidade de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> para determinação da eficiência	59
4.3.6 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro	61
4.3.6.1 Avaliação de crescimento de parte aérea	61
4.3.6.2 Avaliação de crescimento de raiz.....	62
4.3.7 Testes a campo para determinação da eficiência do extrato de <i>R. officinalis</i>	63
4.3.7.1 Avaliação da severidade a campo.....	63
4.3.7.2 Avaliação da produtividade a campo.....	66
4.3.7.2.1 Avaliação da produtividade do feijoeiro desafiado com <i>P. griseola</i>	66
4.3.7.2.2 Avaliação da produtividade do feijoeiro desafiado com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	67
4.4 CONCLUSÃO.....	71
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
5 CAPÍTULO II - FORMULAÇÃO DE EXTRATO DE CÚRCUMA (<i>Curcuma longa</i>) PARA O CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM FEIJOEIRO.....	78
RESUMO.....	78
ABSTRACT	79
5.1 INTRODUÇÃO	80
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	82
5.2.1 Obtenção e manutenção de <i>P. griseola</i>	82
5.2.2 Obtenção e manutenção de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	82
5.2.3 Formulação e determinação da validade do extrato de <i>C. longa</i>	83

5.2.4 Testes <i>in vitro</i> para determinação da validade do extrato de <i>C. longa</i>	84
5.2.4.1 Inibição da germinação de esporos.....	84
5.2.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana.....	84
5.2.5 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de <i>C. longa</i>	85
5.2.5.1 Cultivo em casa de vegetação para determinação da validade	85
5.2.5.2 Aplicação dos extratos com estabilidade acelerada.....	85
5.2.5.3 Inoculação de <i>P. griseola</i> em casa de vegetação	85
5.2.5.4 Inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em casa de vegetação	86
5.2.5.5 Avaliação da severidade para determinação da validade	86
5.2.6 Testes <i>in vitro</i> para determinação da eficiência do extrato de <i>C. longa</i>	86
5.2.6.1 Inibição da germinação de esporos.....	86
5.2.6.2 Inibição da multiplicação bacteriana.....	87
5.2.7 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de <i>C. longa</i>	87
5.2.7.1 Cultivo e manutenção em casa de vegetação.....	87
5.2.7.2 Aplicação dos tratamentos em casa de vegetação	87
5.2.7.3 Inoculação de <i>P. griseola</i> em casa de vegetação	88
5.2.7.4 Inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em casa de vegetação	88
5.2.7.5 Avaliação da severidade para determinação da eficiência.....	88
5.2.8 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro em casa de vegetação ...	88
5.2.8.1 Avaliação de crescimento de parte aérea e raiz.....	89
5.2.9 Testes a campo para determinação da eficiência do extrato de <i>C. longa</i>	89
5.2.9.1 Cultivo a campo.....	90
5.2.9.2 Aplicação dos tratamentos a campo	90
5.2.9.3 Avaliação da severidade a campo.....	90
5.2.9.4 Avaliação da produtividade a campo.....	90
5.2.10 Análise estatística	91
5.2.10.1 Análise estatística dos testes para determinação da validade	91
5.2.10.2 Análise estatística dos testes para determinação da eficiência.....	91
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
5.3.1 Determinação da validade do extrato de <i>C. longa</i>	92
5.3.2 Testes <i>in vitro</i> para determinação da validade do extrato de <i>C. longa</i>	92
5.3.2.1 Inibição da germinação de esporos.....	92

5.3.2.2 Inibição da multiplicação bacteriana.....	93
5.3.3 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de <i>C. longa</i>	94
5.3.3.1 Avaliação da severidade de <i>P. griseola</i> para determinação da validade	94
5.3.3.2 Avaliação da severidade de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> para determinação da validade	95
5.3.4 Testes <i>in vitro</i> para determinação da eficiência do extrato de <i>C. longa</i>	96
5.3.4.1 Inibição da germinação de esporos.....	96
5.3.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana.....	98
5.3.5 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de <i>C. longa</i>	99
5.3.5.1 Avaliação da severidade para determinação da eficiência.....	99
5.3.5.1.1 Avaliação da severidade de <i>P. griseola</i> para determinação da eficiência	99
5.3.5.1.2 Avaliação da severidade de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> para determinação da eficiência	100
5.3.6 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro	101
5.3.6.1 Avaliação de crescimento de parte aérea	101
5.3.6.2 Avaliação de crescimento de raiz.....	102
5.3.7 Testes a campo para determinação da eficiência do extrato de <i>C. longa</i>	104
5.3.7.1 Avaliação da severidade a campo.....	104
5.3.7.2 Avaliação da produtividade a campo.....	105
5.3.7.2.1 Avaliação da produtividade do feijoeiro desafiado com <i>P. griseola</i>	105
5.3.7.2.2 Avaliação da produtividade do feijoeiro desafiado com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	107
5.4 CONCLUSÃO.....	111
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
6 CAPÍTULO III - FORMULAÇÃO DE EXTRATO DE <i>Pycnoporus sanguineus</i> PARA O CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM FEIJOEIRO.....	118
RESUMO.....	118
ABSTRACT	119
6.1 INTRODUÇÃO	120
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	122
6.2.1 Obtenção e manutenção de <i>P. griseola</i>	122
6.2.2 Obtenção e manutenção de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	122

6.2.3	Formulação e determinação da validade do extrato de <i>P. sanguineus</i>	123
6.2.4	Testes <i>in vitro</i> para determinação da validade do extrato de <i>P. sanguineus</i>	124
6.2.4.1	Inibição da germinação de esporos.....	124
6.2.4.2	Inibição da multiplicação bacteriana.....	124
6.2.5	Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de <i>P. sanguineus</i>	125
6.2.5.1	Cultivo em casa de vegetação para determinação da validade	125
6.2.5.2	Aplicação dos extratos com estabilidade acelerada.....	125
6.2.5.3	Inoculação de <i>P. griseola</i> em casa de vegetação	125
6.2.5.4	Inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em casa de vegetação	126
6.2.5.5	Avaliação da severidade para determinação da validade	126
6.2.6	Testes <i>in vitro</i> para determinação da eficiência do extrato de <i>P. sanguineus</i>	126
6.2.6.1	Inibição da germinação de esporos.....	126
6.2.6.2	Inibição da multiplicação bacteriana.....	127
6.2.7	Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de <i>P. sanguineus</i>	127
6.2.7.1	Cultivo em casa de vegetação	127
6.2.7.2	Aplicação dos tratamentos em casa de vegetação	128
6.2.7.3	Inoculação de <i>P. griseola</i> em casa de vegetação	128
6.2.7.4	Inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em casa de vegetação	128
6.2.7.5	Avaliação da severidade para determinação da eficiência.....	128
6.2.8	Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro em casa de vegetação .	129
6.2.8.1	Avaliação de crescimento de parte aérea e raiz.....	129
6.2.9	Análise estatística	129
6.2.9.1	Análise estatística dos testes para determinação da validade	129
6.2.9.2	Análise estatística dos testes para determinação da eficiência.....	129
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	130
6.3.1	Determinação da validade do extrato de <i>P. sanguineus</i>	130
6.3.2	Testes <i>in vitro</i> para determinação da validade do extrato de <i>P. sanguineus</i>	130
6.3.2.1	Inibição da germinação de esporos.....	130
6.3.2.2	Inibição da multiplicação bacteriana.....	131
6.3.3	Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de <i>P. sanguineus</i>	131
6.3.3.1	Avaliação da severidade de <i>P. griseola</i> para determinação da validade ..	131

6.3.3.2 Avaliação da severidade de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> para determinação da validade	133
6.3.4 Testes <i>in vitro</i> para determinação da eficiência do extrato de <i>P. sanguineus</i>	134
6.3.4.1 Inibição da germinação de esporos.....	134
6.3.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana.....	135
6.3.5 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de <i>P. sanguineus</i>	136
6.3.5.1 Avaliação da severidade para determinação da eficiência.....	137
6.3.6 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro	139
6.3.6.1 Avaliação de crescimento de parte aérea	139
6.3.6.2 Avaliação de crescimento de raiz.....	140
6.4 CONCLUSÃO.....	143
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	149

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1: Percentual de germinação de esporos de *P. griseola* em função do tratamento com extratos secos de *R. officinalis* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$ 57
- Figura 4.2: Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em função do tratamento com extratos secos de *R. officinalis* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5% 58
- Figura 4.3: Massas fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *R. officinalis* comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%. 62
- Figura 4.4: Massas fresca (A) e seca (B) da raiz de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *R. officinalis* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% 63
- Figura 4.5: Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), número de grãos por planta (C), massa de 100 grãos (D), massa de grãos por planta (E) e produtividade (F) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de alecrim (*R. officinalis*) na concentração de 150 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0) ou fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹). As plantas foram inoculadas três vezes ao longo do ciclo da cultura com suspensão de esporos de *P. griseola* (4x10⁴ esporos mL⁻¹) aos 3 dias após a aplicação de cada tratamento. Asterisco (*) indica que não houve diferença significativa pela ANAVA ao passo que médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% 66

Figura 4.6: Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), número de grãos por planta (C), massa de 100 grãos (D), massa de grãos por planta (E) e produtividade (F) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de alecrim (*R. officinalis*) na concentração de 150 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0) ou antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina). As plantas foram inoculadas três vezes ao longo do ciclo da cultura com suspensão bacteriana de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (5 x 10⁷ UFC mL⁻¹) aos 3 dias após a aplicação de cada tratamento. Asterisco (*) indica que não houve diferença significativa pela ANAVA ao passo que médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%. 70

Figura 5.1: Percentual de germinação de esporos de *P. griseola* em função do tratamento com extratos secos de *C. longa* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$ 97

Figura 5.2: Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em função do tratamento com extratos secos de *C. longa* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5% 98

Figura 5.3: Massas fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *C. longa*, nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5% 102

Figura 5.4: Massas fresca (A) e seca (B) da raiz de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *C. longa* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%. 103

Figura 5.5: Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), número de grãos por planta (C), massa de 100 grãos (D), massa de grãos por planta (E) e produtividade (F) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de cúrcuma (*C. longa*) na concentração de 50 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0) ou fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹). As plantas foram inoculadas três vezes ao longo do ciclo da cultura com suspensão de esporos de *P. griseola* (4x10⁴ esporos mL⁻¹) aos 3 dias após a aplicação de cada tratamento. Asterisco (*) indica que não houve diferença significativa pela ANAVA ao passo que médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%. 106

Figura 5.6: Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), número de grãos por planta (C), massa de 100 grãos (D), massa de grãos por planta (E) e produtividade (F) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de cúrcuma (*C. longa*) na concentração de 50 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0) ou antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina). As plantas foram inoculadas três vezes ao longo do ciclo da cultura com suspensão bacteriana de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (5 x 10⁷ UFC mL⁻¹) aos 3 dias após a aplicação de cada tratamento. Asterisco (*) indica que não houve diferença significativa pela ANAVA ao passo que médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%. 108

Figura 6.1: Percentual de germinação de esporos de *P. griseola* em função do tratamento com extratos secos de *P. sanguineus* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$ 135

Figura 6.2: Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em função do tratamento com extratos secos de *P. sanguineus* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%. 136

Figura 6.3: Massas fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *P. sanguineus* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%. 140

Figura 6.4: Massas fresca (A) e seca (B) da raiz de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *P. sanguineus* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Variável seguida de asterisco (*) indica não significância estatística. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%. 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Germinação de esporos de <i>P. griseola</i> em função dos tratamentos com extratos secos de <i>R. officinalis</i> submetidos ao processo de estabilidade acelerada	52
Tabela 4.2: Multiplicação da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em função dos tratamentos com extratos secos de <i>R. officinalis</i> submetidos ao processo de estabilidade acelerada	52
Tabela 4.3: Severidade da mancha angular causada por <i>P. griseola</i> em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extrato seco de <i>R. officinalis</i> submetido ao processo de estabilidade acelerada.	53
Tabela 4.4: Severidade do crestamento bacteriano comum causado por <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extrato seco de <i>R. officinalis</i> submetido ao processo de estabilidade acelerada	55
Tabela 4.5: Severidade e percentual de controle da mancha angular causada por <i>P. griseola</i> em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratados com extratos secos de <i>R. officinalis</i> na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas.	59
Tabela 4.6: Severidade e percentual de controle do crestamento bacteriano comum causado por <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratados com extratos secos de <i>R. officinalis</i> na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas.	61
Tabela 4.7: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de alecrim (<i>R. officinalis</i>) na concentração de 150 mg L ⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0), fungicida ou antibiótico e desafiadas com <i>P. griseola</i> ou <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .	64
Tabela 5.1: Germinação de esporos de <i>P. griseola</i> em função dos tratamentos com extratos secos de <i>C. longa</i> submetidos ao processo de estabilidade acelerada.	93
Tabela 5.2: Multiplicação da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em função dos tratamentos com extratos secos de <i>C. longa</i> submetidos ao processo de estabilidade acelerada.	93
Tabela 5.3: Severidade da mancha angular causada por <i>P. griseola</i> em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extrato seco de <i>C. longa</i> submetido ao processo de estabilidade acelerada.	94
Tabela 5.4: Severidade do crestamento bacteriano comum causado por <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de <i>C. longa</i> submetidos ao processo de estabilidade acelerada	95

Tabela 5.5: Severidade e percentual de controle da mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratados com extratos secos de *C. longa* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas..100

Tabela 5.6: Severidade e percentual de controle do crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratados com extratos secos de *C. longa* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas..... 101

Tabela 5.7: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de cúrcuma (*C. longa*) na concentração de 150 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0), fungicida ou antibiótico e desafiadas com *P. griseola* ou *X. axonopodis* pv. *phaseoli*..... 104

Tabela 6.1: Germinação de esporos de *P. griseola* em função dos tratamentos com extratos secos de *P. sanguineus* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.....130

Tabela 6.2: Multiplicação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em função dos tratamentos com extratos secos de *P. sanguineus* submetidos ao processo de estabilidade acelerada 131

Tabela 6.3: Severidade da mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *P. sanguineus* submetidos ao processo de estabilidade acelerada. 132

Tabela 6.4: Severidade do crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *P. sanguineus* submetidos ao processo de estabilidade acelerada..... 133

Tabela 6.5: Severidade e percentual de controle da mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *P. sanguineus* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas..137

Tabela 6.6: Severidade e percentual de controle do crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *P. sanguineus* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas 139

RESUMO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) apresenta importância significativa no âmbito socio econômico mundial, porém, a produção é comprometida por doenças fúngicas como a mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) e bacteriana como o crestamento comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), que dependem basicamente de controle químico para o manejo, comprometendo, em contrapartida, a qualidade ambiental e a saúde do agricultor e consumidor. Com o objetivo de desenvolver um extrato alternativo aos fungicidas, formulou-se extrato seco de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma (*Curcuma longa*) e *Pycnoporus sanguineus* e realizou-se testes de estabilidade acelerada, atividade antimicrobiana direta, efeitos sobre o desenvolvimento vegetativo do feijoeiro e eficiência na redução da severidade dessas doenças. Foram usadas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, além da testemunha água, e controles químicos fungicida (azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹) para os ensaios com mancha angular e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para o crestamento bacteriano comum. O melhor resultado foi testado a campo avaliando-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e aspectos de produtividade. Para o extrato seco de alecrim, os resultados indicaram que a validade é de 24 meses. Houve especificidade da validade dos extratos de cúrcuma e *P. sanguineus* dependendo do patossistema, assim, para a mancha angular do feijoeiro, a validade do extrato seco de cúrcuma é de 24 meses, e quando se visa controlar o crestamento bacteriano comum a validade é de 18 meses. Da mesma forma, a validade do extrato seco de *P. sanguineus* para mancha angular é de 24 meses e para o crestamento bacteriano é de 12 meses. *In vitro*, apenas o extrato de alecrim não apresentou atividade antimicrobiana direta sobre *P. griseola*, os demais tratamentos tenderam a inibir a germinação de *P. griseola* e a multiplicação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Todos os tratamentos tenderam a incrementar massa fresca e seca da parte aérea e raiz do feijoeiro. A severidade de ambas as doenças em casa de vegetação não foi significativa para o extrato de *P. sanguineus*, no entanto a severidade foi reduzida para a concentração de 150 mg L⁻¹ para o extrato de alecrim e 50 mg L⁻¹ para cúrcuma. Estas últimas concentrações foram testadas a campo com 1, 2 e 3 aplicações em intervalos de 14 dias a partir da semeadura. A campo, o extrato seco de alecrim reduziu a AACPD e incrementou a produtividade (Kg ha⁻¹) quando realizado uma aplicação aos 14 dias da semeadura, em plantas desafiadas com *P. griseola*, e três aplicações para o crestamento bacteriano comum. Para o extrato de cúrcuma, houve necessidade de três aplicações para controlar ambas as doenças. Estes tratamentos foram superiores a testemunha e semelhantes ao controle químico. Em suma, a pesquisa desenvolvida com alecrim e cúrcuma fornece um extrato eficiente para o controle da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro. Esses extratos, juntamente com *P. sanguineus*, estão sendo testados em diferentes culturas para o controle de doenças, podendo ampliar a recomendação para outras plantas, sendo uma alternativa viável e ecologicamente correta para a produção agrícola, respeitando o meio ambiente, o produtor e o consumidor.

Palavras-chave adicionais: *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa*, *Pycnoporus sanguineus*, *Phaseolus vulgaris*.

PLANT AND FUNGAL FORMULATED EXTRACTS FOR ALTERNATIVE CONTROL OF BEAN DISEASES

ABSTRACT

The bean (*Phaseolus vulgaris*) has a significant economic and social importance, but the production is affected by fungal diseases such as angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola*) and common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), which depend primarily of chemical control for the management, compromising, however, environmental quality and health of the farmer and consumer. In order to develop an alternative product that respects the environment, dry extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), turmeric (*Curcuma longa*) and *Pycnopus sanguineus* were submitted to accelerated stability tests, antimicrobial activity, effects on vegetative growth of bean and efficiency in reducing the severity of that disease. Thus were used concentrations of 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹, water and chemical fungicides (azoxystrobin 40 mg L⁻¹) for angular leaf spot and antibiotic (22.5 mg L⁻¹ + oxytetracycline 225 mg L⁻¹ streptomycin) for common bacterial blight. The best result was field-tested on area under the disease progress curve (AUDPC) and on aspects of productivity. To the extract of rosemary, the results report that the validity is 24 months. To turmeric extracts and *P. sanguineus* the validity depending on the pathosystem, and to angular leaf spot, the validity of the extract of turmeric is 24 months, and when it seeks to control bacterial blight shelf life is 18 months. Likewise, extract of *P. sanguineus* to control angular leaf spot the validity of 24 months and for the bacterial blight 12 months. *In vitro*, only rosemary extract showed no antimicrobial activity on *P. griseola*, the other treatments tended to inhibit the germination of *P. griseola* and the multiplication of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. All treatments tended to increase fresh and dry mass of shoots and roots of beans. The severity of both diseases in the greenhouse was not reduced for the extract of *P. sanguineus*, but was reduced for concentrations of 150 mg L⁻¹ for rosemary extract and 50 mg L⁻¹ for turmeric. Those latter concentrations were tested in the field with 1, 2 and 3 shots at intervals of 14 days after planting. In the field, the dry extract of rosemary reduced the AACPD and increased the productivity (kg ha⁻¹) with one application 14 days after planting. To angular leaf spot, and with three applications for common bacterial blight. To the extract of turmeric, it is suggested three applications for controlling both diseases. These treatments were similar to chemical controls. Thus study conducted with rosemary and turmeric provides an efficient product for the control of angular leaf spot and bacterial blight of bean. These products, along with *P. sanguineus*, are being tested in different cultures to disease control, and may extend the recommendation for other plants, being a viable alternative and environmentally friendly for agricultural production, respecting the environment, the producer and consumer.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa*, *Pycnopus sanguineus*, *Phaseolus vulgaris*.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro, que tem como espécie mais cultivada o *Phaseolus vulgaris*, conhecido popularmente como feijão comum, é a base alimentar da população brasileira devido a qualidade da composição bromatológica dos grãos (BORÉM & CARNEIRO, 2006; FRANCO, 1997). O apreço ao produto associado ao baixo valor agregado na pós-colheita permite suprir todas as classes sociais, o que em contrapartida aumenta a demanda de produção que muitas vezes não atende o mercado interno (YOKOYAMA & STONE, 2000). Uma das alternativas para aumentar a produção de feijoeiro é aumentar a eficiência do controle de doenças, principalmente mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) e o crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), destacadas pela redução na produção e agregação de custo devido ao manejo necessário.

Uma técnica explorada para o controle dessas doenças é a pulverização com agrotóxicos (SARTORATO & RAVA, 2003), a qual se apresenta como solução em imediato, mas a longo prazo oferece riscos para a sociedade e ao meio ambiente (GHINI & KIMATI, 2000), podendo afetar a saúde do homem, a qualidade do solo, água, ar e exercer um impacto sobre a vida selvagem (SILVA & FAY, 2004), uma vez que apenas 1% dos agrotóxicos aplicados de fato atingem o organismo alvo (RAVEN, EVERT & EICHHORN, 2010). Para reduzir essa agressão ao meio ambiente, deve-se considerar um manejo integrado da cultura, associando o uso de produtos químicos a práticas culturais, seleção de cultivares resistentes (AZEVEDO, 2003), controle físico (BEDENDO, MASSOLA Jr. & AMORIM, 2011) e controle alternativo de doenças.

O controle alternativo de doenças, o qual inclui o controle biológico e a indução de resistência em plantas, prioriza o uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência (SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN & CRUZ, 2003) e, atualmente, apresentam-se imprescindíveis para o controle de enfermidades de plantas de forma eficiente e ao mesmo tempo menos agressivos a saúde humana e ao equilíbrio do ecossistema (ROMEIRO, 2008).

A indução de resistência envolve a expressão genética dos mecanismos de defesa latentes na planta, com efeitos locais e sistêmicos (MORAES, 1992), perante aplicação exógena de indutores de resistência (GUZZO et al., 1999). Os indutores são compostos por agentes bióticos ou abióticos (HAMMERSCHMIDT & DANN,

1997) capazes de ativar mecanismos chaves de resistência, como as enzimas peroxidase (FRIC, 1976) e polifenoloxidasas, além de fototoxinas, espécies ativas de oxigênio (PASCHOLATI, 2011) e β -1,3-glucanases (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993), além de alterações fisiológicas como a síntese de proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP) (AGRIOS, 2005) e clorofila (STANGARLIN & PASCHOLATI, 2000).

Os indutores de resistência em plantas são classificados em bióticos, no qual se consideram os microorganismos viáveis ou inativos, e agentes abióticos, como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (HIJWEGWN et al., 1996) e acibenzolar-S-metil (ASM) (PASCHOLATI, 2011), metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico, fosfitos e silicatos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005).

Entre os indutores não convencionais pode-se incluir os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN & CRUZ, 2003; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005), bem como os extratos obtidos de cogumelos (DI PIERO, GARCIA & TONUCCI, 2005). Entre as plantas medicinais testadas em patógenos do feijoeiro ressalta-se alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (VIGO-SCHULTZ, 2008; ARSLAN, ILHAN & KARABULUT, 2009; BRAND et al., 2010) e curcuma (*Curcuma longa* L.) (SINGH & RAÍ, 2000) e entre os basidiomicetos cita-se *Pycnoporus sanguineus* (ASSI, 2005; BALDO, 2008; BALDO et al., 2008; VIECELLI et al., 2009; TOILLIER et al., 2010).

Os resultados em potencial com alecrim, cúrcuma e *P. sanguineus* serviram de alicerce para o objetivo do trabalho em formular três extratos baseadas nos princípios ativos dessas plantas e fungo e determinar a validade e a eficiência dos mesmos para estabelecer a recomendação técnica, visando o controle da mancha angular e do crestamento bacteriano comum na cultura do feijoeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro é cultivado em todo o mundo e apresenta alto valor nutritivo (BORÉM & CARNEIRO, 2006). Para cada porção de 100 g, o feijão fornece 22 g de proteínas, 57 g de glícidos, 1,5 g de gorduras, 120 mg de cálcio, 8,2 mg de ferro, 2,4 mg de niacina, 1 mg de vitamina C, 0,37 mg de vitamina B1, 0,16 mg de vitamina B2, 0,2 mg de vitamina B6 e 180 µm de ácido fólico (FRANCO, 1997). Esta rica composição bromatológica é um dos principais responsável pela difusão da cultura.

O feijoeiro é classificado no gênero *Phaseolus*, que inclui aproximadamente 100 espécies, das quais apenas quatro são cultivadas: *P. vulgaris* L. (feijão comum), *P. coccineus* L. (feijão ayocote), *P. acutifolius* F. (feijão tepari) e *P. lunatus* L. (feijão de lima). O feijão comum é o mais plantado, sendo responsável por cerca de 95% da produção mundial de *Phaseolus* (YOKOYAMA & STONE, 2000). É uma planta anual herbácea e termófila, isto é, não suporta geada. Seu cultivo visa principalmente a produção de grãos (VIEIRA & HEMP, 1992).

A produção nacional de feijão registrada em 2011, considerando as três safras do produto, foi de 3.550.107 toneladas, 10,9% maior que a da safra de 2010, enquanto que a área colhida de 3.707.201 ha também apresentou aumento de 7,1%. O produto é cultivado em todo o território nacional, sendo que os seis principais Estados (PR, MG, GO, SP, CE e BA), responderam por 70,1% do total produzido no País. O Paraná manteve-se como principal produtor, com uma participação na produção de 23%, ou seja, 815.998 toneladas, 3% superior a obtida em 2010 (IBGE, 2011).

Porém, a produção brasileira de feijão tem sido insignificante para abastecer o mercado interno. A partir de 1994 o país aumentou suas importações, predominando a importação do feijão preto vindo da Argentina, onde o consumo de feijão não passa de 0,3 kg hab⁻¹ ano⁻¹ (YOKOYAMA & STONE, 2000). Segundo Yokoyama (2000), uma projeção futura indica o aumento da demanda do produto, considerando o crescimento médio de 0,01% ao ano, estima-se que o consumo *per capita* que atualmente é de 16,0 kg hab⁻¹ ano⁻¹ passe para 18,6 kg hab⁻¹ ano⁻¹ em 2014.

O aumento da demanda do feijão garante a venda do produto, motivo que estimula os agricultores, a qual, de acordo com o Censo Agropecuário (2006) é feita

basicamente por pequenos produtores, o que facilita o manejo de doenças, principal gargalo da produção do feijoeiro, que apresenta suscetibilidade a um grande número de patógenos.

O feijoeiro é afetado por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematóides, as quais contribuem para o seu baixo rendimento, em todas as regiões do mundo onde é praticada (SARTORATO; RAVA & RIOS, 1996). Muitas doenças podem causar, dependendo das condições do ambiente, danos totais na produção ou, então, dependendo do nível de contaminação, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo (PAULA JUNIOR & ZAMBOLIM, 1998). Esses danos podem ser observados tanto nas plantas como nos grãos armazenados, comprometendo a qualidade e a comercialização do produto. Entre as doenças, destaca-se a mancha angular e o crestamento comum do feijoeiro.

2.2 DOENÇAS DO FEIJOEIRO

2.2.1 MANCHA ANGULAR - *Pseudocercospora griseola*

A mancha angular do feijoeiro, causada pelo fungo hemibiotrófico *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun (sin. *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris) ocorre nas regiões tropicais e subtropicais e encontra-se disseminada em todas as partes produtoras de feijão do mundo. Essa doença, até 1990 era considerada secundária (DALLA PRIA et al., 1999) e atualmente é um dos principais problemas para a cultura do feijão devido a alta intensidade com que vem ocorrendo, sendo responsável por perdas significativas na produção (VALE, COSTA & ZAMBOLIM, 1997). No Paraná, a mancha angular vem merecendo atenção, principalmente em regiões agrícolas que fazem o plantio consecutivo de variedades suscetíveis (CARNEIRO, AMORIM & BERGAMIN FILHO, 1997), onde os danos podem atingir 40% na ausência de medidas de controle (DALLA PRIA et al., 1999).

2.2.1.1 SINTOMAS

Os sintomas da doença manifestam-se nas folhas, caule e vagens, ramos e pecíolos (VALE, COSTA & ZAMBOLIM, 1997). Nas folhas primárias, as lesões apresentam conformação irregular de cor castanho escura. Nas folhas trifoliadas formam-se lesões necróticas de coloração acinzentada e formato irregular. Posteriormente, estas adquirem coloração marrom-escura e formato angular, sendo

delimitadas pelas nervuras (BIANCHINI, MARINGONI & CARNEIRO, 2005). Essas lesões podem coalescer, causando amarelecimento e desfolha prematura das plantas. Nas vagens, as lesões são superficiais, circulares e com coloração castanho avermelhada e bordos escuros, favorecendo a produção de sementes mal desenvolvidas ou enrugadas. No caule, ramos e pecíolos as lesões são alongadas e de cor castanha (VALE, COSTA & ZAMBOLIM, 1997).

A infecção das sementes reduz a germinação e o desenvolvimento das plântulas. *P. griseola* produz conidióforos sobre as lesões após períodos de 24 a 48 horas de contínua umidade (SARTORATO, RAVA & RIOS, 1996), formando uma eflorescência de cor cinza escura a negra, característica da frutificação do fungo (SARTORATO & RAVA, 2003).

2.2.1.2 ETIOLOGIA

A mancha angular do feijoeiro é causada pelo fungo hemibiotrófico *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun [sin. *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris]. Produz sinemas (corêmios) na face inferior da folha, compostos por 8 a 40 conidióforos paralelos e escuros, compondo um feixe colunar com os esporos na extremidade. Os sinemas apresentam 250 µm de comprimento e 20-40 µm de largura, os quais formam tufo visíveis a olho nu. Os conídios são de cor cinza, cilíndricos a fusiformes, às vezes curvos, com dois a seis septos, medindo 35-70 µm de comprimento e 5-7,5 µm de largura no centro e 1,5-2 µm de largura na base. *P. griseola* sobrevive em sementes e restos de cultura, sendo disseminado pelo vento, respingos de chuva e partículas de solo. A viabilidade do fungo na semente diminui com o tempo. Os conídios germinam em temperaturas entre 8 e 32 °C, com ótimo a 20-28 °C. O desenvolvimento da doença ocorre em temperaturas entre 16 e 28 °C, preferencialmente a 24 °C. O fungo penetra pelos estômatos e coloniza o hospedeiro. Os sintomas aparecem cerca de 8-12 dias após, quando então o estroma se desenvolve na cavidade sub-estomática. A esporulação ocorre durante períodos de alta umidade (BIANCHINI, MARINGONI & CARNEIRO, 2005).

2.2.1.3 CONTROLE

O controle da mancha angular pode ser feito através do uso de sementes saudáveis, eliminação dos restos culturais infectados, rotação de culturas, variedades com bom nível de resistência (VALE, COSTA & ZAMBOLIM, 1997), tratamento

químico da semente e pulverização da cultura com fungicidas (SARTORATO & RAVA, 2003).

2.2.2 CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM – *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

O crestamento bacteriano comum é causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1987) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 (BIANCHINI, MARINGONI & CARNEIRO, 2005). É uma enfermidade de disseminação mundial, que pode causar prejuízos severos (VIEIRA, 1988) principalmente em cultivos nas áreas mais quentes e úmidas (VIEIRA, VIEIRA & VIEIRA, 2001). As regiões muito baixas (inferior a 300 metros de altitude) normalmente são caracterizadas pela reduzida incidência dessa doença. Apesar de sua especificidade, não se recomenda o uso de antibióticos devido a baixa eficiência desses produtos (FANCELLI & DOURADO NETO, 2007).

2.2.2.1 SINTOMAS

A bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* causa sintomas visíveis em toda a parte aérea da planta, inicialmente como manchas encharcadas nas folhas, que aumentam de tamanho e progridem para necróticas. Pode haver um tênue halo amarelado ao redor das lesões. Temperatura e umidades elevadas favorecem o desenvolvimento da doença (BIANCHINI, MARINGONI & CARNEIRO, 2005).

O principal modo de disseminação da bactéria de uma área para a outra se faz através de sementes contaminadas, e dentro de uma plantação, através de respingos de chuva, implementos agrícolas e insetos. As plantas originárias de sementes infectadas podem desenvolver lesões que circundam o nó cotiledonar, provocando o seu enfraquecimento e a quebra do caule, o qual não suporta o peso das vagens (ROSOLEM & MARUBAYASHI, 1994). As sementes infectadas podem apresentar-se descoloridas, enrugadas, ou simplesmente não apresentar sintomas visíveis (SARTORATO & RAVA, 2003).

2.2.2.2 ETIOLOGIA

X. axonopodis pv. *phaseoli* forma colônias amareladas de bordos lisos, convexas, brilhantes e circulares quando cultivada em meio nutriente-ágar contendo glicose ou sacarose. A bactéria é baciliforme, gram-negativa, possui um flagelo polar

e cresce a 37 °C (BIANCHINI, MARINGONI & CARNEIRO, 2005). A bactéria sobrevive em sementes por períodos variáveis de dois a 15 anos, no estado hipobiótico (latente), podendo estar localizada interna ou externamente à semente, sem perder sua patogenicidade (RAVA & SARTORATO, 1994). A abrasão em folhas de feijoeiro, provocadas por partículas de solo dispersas pelo vento, é suficiente para favorecer epidemias do crestamento bacteriano comum (AMORIM & PASCHOLATI, 2011).

2.2.2.3 CONTROLE

O controle é realizado através da adoção de várias medidas culturais. A maioria das variedades em uso nas diferentes regiões do país é suscetível e a eficácia do controle com produtos bactericidas, incluindo fungicidas a base de cobre, é contraditória (BIANCHINI, MARINGONI & CARNEIRO, 2005). Dessa forma, as recomendações para o controle do crestamento bacteriano comum no feijoeiro incluem a rotação de culturas com gramíneas por pelo menos um ano, evitando-se com isso a semeadura de feijão sobre feijão, a utilização de sementes certificadas e a interdição do trânsito dentro da lavoura, especialmente quando a cultura encontra-se molhada pelo orvalho ou chuva, para impedir a disseminação secundária (SARTORATO & RAVA, 2003).

2.3 CONTROLE DE DOENÇAS

A alta intensidade com que algumas doenças vem ocorrendo nas culturas tem obrigado os produtores a estabelecerem medidas de controle químico muitas vezes ineficientes e onerosas (VALE, COSTA & ZAMBOLIM, 1997) e que acarretam, em longo prazo, o surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, além do ressurgimento de pragas e efeitos negativos para a sociedade e ao meio ambiente (GHINI & KIMATI, 2000).

Nesse âmbito, a conscientização da sociedade em relação aos problemas ecológicos causados pelos agroquímicos fez com que produtores e consumidores valorizassem o desenvolvimento agrícola sustentável (ASSIS, 2005), na qual está inserido o controle alternativo de doenças de plantas que isolado ou associado ao controle químico, garante eficiência no manejo de doenças com redução de danos ao meio ambiente.

2.3.1 CONTROLE QUÍMICO

O controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir alta produtividade e qualidade de produção (KIMATI, 1995). Porém, o uso indiscriminado de tais produtos pode acarretar, em longo prazo, o surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas (GHINI & KIMATI, 2000), causadas por mutação ou pré existência de genes que conferem resistência à população (AGOSTINETTO & VARGAS, 2009), além do ressurgimento de pragas e efeitos negativos para a sociedade e ao meio ambiente (GHINI & KIMATI, 2000). Os danos ambientais causados pelos agroquímicos atuam principalmente no balanço de microrganismos do solo, deficiência de nutrientes e mudanças nas propriedades físico-químicas do solo, resultando na diminuição da produtividade (CHOU, 1999).

Aproximadamente meio milhão de toneladas de pesticidas e herbicidas são produzidas anualmente para aplicação em culturas, apenas nos Estados Unidos. Desse total, estimou-se que apenas 1% aproximadamente de fato alcança o organismo alvo. A maior parte do restante pode chegar ao solo, à água ou a organismos que não se deseja atingir no ecossistema. Assim, buscam-se métodos menos danosos para melhorar os rendimentos agrícolas (RAVEN, EVERT & EICHHORN, 2010) e/ou alternativas de controle de fitopatógenos que minimizem os impactos ambientais e mantenham a alta produtividade agrícola. Neste contexto, a própria natureza vem sendo investigada como fonte de soluções em potencial (SAITO & LUCHINI, 1998) para o controle alternativo de doenças de plantas.

2.3.2 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS

A modernização da agricultura provocou o aumento da produtividade agrícola sem considerar o agricultor e o meio ambiente como constituintes do processo de desenvolvimento, gerando problemas ambientais e sociais. Como resposta, surge a agricultura alternativa de produção, restrita, inicialmente, a pequenos produtores e atualmente insatisfatória para atender aos consumidores conscientes (ASSIS, 2005). Nesse enfoque global da agricultura e do desenvolvimento rural, solicita-se que a relação da sociedade com o meio ambiente não seja tratada como uma questão econômica, derivada da manipulação físico química e do aporte de capital, mas como um processo complexo que exige a compreensão do ecossistema para manter o desenvolvimento agrícola (MATTOS,

2006), resgatando para isso o conhecimento empírico para associar as mais modernas técnicas de manejo (VIECELLI & MOREIRA, 2011), especialmente no controle de doenças de plantas e instituindo assim o controle alternativo.

Dessa forma, o controle alternativo de doenças apresenta um grande desafio ao associar a eficiência do controle com a segurança à saúde humana e ao equilíbrio do ecossistema, recomendando para isso a ativação de mecanismos de defesa da planta, fazendo com que ela apresente uma autodefesa, ao invés de intoxicá-la com defensivos (ROMEIRO, 2008). Nesse contexto, o controle alternativo, como a indução de resistência, não necessariamente descarta os métodos tradicionais de controle químico ou cultural, mas realiza de forma mais consciente o manejo da cultura (MORAES, 1992) para manter a alta produtividade agrícola (SAITO & LUCHINI, 1998) de forma ecologicamente correta e segura.

2.3.2.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Em uma interação complexa do parasitismo, onde mecanismos biológicos e moleculares definem resistência ou suscetibilidade (PASCHOLATI, 2011). Esta é iniciada quando os patógenos atacam as plantas para conseguir parasitar a célula vegetal e a agressão é restringida por barreiras físicas e químicas que constituem o mecanismo de defesa de uma planta. As barreiras físicas atuam sobre a penetração ou colonização do patógeno, e os bioquímicos geram condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN & PASCHOLATI, 2008).

As barreiras de defesa formadas antes da presença do patógeno e denominada de constitutiva, são representadas por estruturas como as ceras, cutícula, bem como substâncias químicas pré-formadas, como os fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fototoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (RESENDE & MACHADO, 2000; PASCHOLATI, 2011). Entretanto, há mecanismos de defesa produzidos ou ativados somente na presença do patógeno (ativos ou induzíveis). Estes mecanismos envolvem a formação de estruturas como papilas, halos, lignificação, camada de cortiça, tiloses e deposição de goma, além de compostos como fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP) (RESENDE & MACHADO, 2000; CAVALCANTI, BRUNELLI & STANGARLIN, 2005; TAIZ & ZEIGER, 2006; PASCHOLATI, 2011).

Esses mecanismos de defesa envolvem alterações bioquímicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas como a peroxidase (FRIC, 1976), β -1,3-glucanases (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993) e polifenoloxidasas (AGRIOS, 2005), além de alterações fisiológicas como o teor de clorofila (STANGARLIN & PASCHOLATI, 2000; VIECELLI et al., 2010; PASCHOLATI, 2011).

A ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas pode ser local, ou seja, apenas nos tecidos desafiados, ou sistêmico quando que se manifesta a distância do local instigado (MORAES, 1992) e pode durar por períodos de tempo variáveis (BEDENDO, MASSOLA Jr. & AMORIM, 2011) em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997) capazes de gerar respostas de resistência na planta (GUZZO et al., 1999). Produtos ou agentes com essa capacidade são classificados como indutores de resistência.

Os indutores de resistência em plantas são classificados em bióticos, no qual se consideram os microorganismos viáveis ou inativos como, por exemplo, *Bacillus cereus*, testado na cultura do feijoeiro contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (KUHN, 2007), e agentes abióticos, como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (HIJWEGWN et al., 1996), acibenzolar-S-metil (ASM) (PASCHOLATI, 2011), metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico, fosfitos e silicatos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005).

O primeiro indutor de resistência de uso comercial foi registrado em 1995, representado pelo acibenzolar-S-metil (ASM), o qual contextualizou uma nova classe de defensivos denominada de ativadores de plantas. Posteriormente outros produtos foram lançados no mercado com o mesmo potencial e possíveis de serem empregados no manejo de doenças em plantas (PASCHOLATI, 2011).

Além dos produtos comerciais disponíveis, pesquisas revelam a eficiência de extratos de plantas medicinais no controle de doenças, como o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) no combate a podridão mole (*Rhizopus* sp.) e a antracnose em morangueiro (*Colletotrichum fragariae*) (RÖDER, 2006), a cladosporiose (*Cladosporium fulvum*) (ITAKO et al., 2009) e a mancha bacteriana em tomateiro (*Xanthomonas vesicatoria*) (STANGARLIN & KUHN, 2009). Outra planta medicinal em destaque é a cúrcuma (*Curcuma longa*), relatada para o crestamento foliar (*Cercospora kikuchi*) e oídio da soja (*Microsphaera diffusa*) (BECKER et al., 2004), para murcha bacteriana em mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*)

(KUHN et al. (2006) e mancha bacteriana em tomateiro (*Xanthomonas vesicatoria*) (STANGARLIN & KUHN, 2009).

Basidiocarpos também são relatados com resultados promissores no controle de doenças, como *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* contra antracnose em pepino (*Colletotricum lagenarium*) (DI PIERO & PASCHOLATI, 2004). O basidiocarpo *P. sanguineus*, conhecido popularmente como orelha de pau, igualmente apresenta potencialidade do tratamento de enfermidades vegetais, como a antracnose do feijoeiro (*Colletotrichum lindemuthianum*) (ASSI, 2005; BALDO, 2008), mancha angular do feijoeiro causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (VIECELLI, 2008; VIECELLI et al., 2009), cretamento bacteriano comum do feijoeiro incitada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (TOILLIER et al., 2010), ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) (IURKIV, 2009), ferrugem da videira (*Phakopsora euvtis*) e ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus*) (BALDO et al., 2008).

Mesmo com resultados potenciais dos indutores citados, poucos trabalhos foram estendidos a casa de vegetação e/ou campo, transparecendo a necessidade de continuação e conclusão das pesquisas para a elaboração de formulados, obtenção de registro do extrato e informações como concentração, quantidade de calda, números de aplicações e época de aplicação para ser repassado aos agricultores e de fato concretizar o objetivo das pesquisas, que visam o controle alternativo de doenças em plantas por meio da indução de resistência, utilizando extratos obtidos de plantas medicinais ou basidiocarpos. Essa restrição impossibilita a transferência da tecnologia aos agricultores, restando poucas opções de produtos que podem ser utilizados na agricultura, especialmente a orgânica.

Dessa forma, a Unioeste – Universidade Estadual do Paraná, pela orientação do professor Doutor José Renato Stangarlin, criou o grupo de pesquisa em Controles Biológico e Alternativo em Fitossanidade – COBALFI, visando respaldar a comunidade científica e os agricultores no manejo correto e consciente para o controle de pragas e doenças em plantas; e para o qual esse trabalho integra.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil.** – Passo Fundo: Bethier, 350p. 2009.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology.** 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press. p.207-248, 2005.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S.F. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia princípios e conceitos.** Piracicaba: Agronômica Ceres, vol. 1, 4.ed. p.61-98, 2011.
- ARSLAN, U.; ILHAN, K.; KARABULUT, O.A. Antifungal activity of aqueous extracts of spices against bean rust (*Uromyces appendiculatus*). **Allelopathy Journal.** v. 24, n.1 p.207-213, 2009.
- ASSI, L. Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib, na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L. ex. Fr.). Dissertação Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 51 p. 2005.
- ASSIS, R.L. Agroecologia: visão histórica e perspectiva no Brasil. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. **Agroecologia princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável.** Brasília, DF.:Embrapa, p.174-176, 2005.
- AZEVEDO, L.A.S. **Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional.** São Paulo: LASA Suporte em Proteção de Plantas, 320p. 2003.
- BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus*.** Marechal Cândido Rondon. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 72p. 2008.
- BALDO, M.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KHUN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Inibição da germinação de esporos de *Phakopsora euvitis* e *Uromyces appendiculatus* pelo extrato de *Pycnoporus sanguineus*. In: XXXI Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas-Sp. **Summa Phytopathologica.** Botucatu-SP: UNESP-FCA, v. 34. p.94, Suplemento, 2008.
- BECKER, A.; VIGO-SCHULTZ, S.C.; STANGARLIN, J.R.; BALBI-PEÑA, M.I.; KLAHOLD, C.A. & SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle alternativo das doenças de final de ciclo e oídio na cultura da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, Suplemento, p.163, 2004.
- BEDENDO, I.P.; MASSOLA JUNIOR., N.S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In.: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia.** Volume 1: Princípios e conceitos. 4ª edição Piracicaba: Ceres, p. 367-388, 2011.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds). **Manual de Fitopatologia**. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. 4ª edição. São Paulo: Ceres, p.333-349, 2005.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa, MG: Editora UFV, p.13-18, 2006.

BRAND, S.C.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; MILANESI, P.M.; SCHEREN, M.B.; ANTONELLO, L.M. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, 2010.

CARNEIRO, S.M.T.P.G.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Avaliação de dano provocado pela mancha angular em feijoeiro: relação entre severidade, área foliar e componentes de produção. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.427-431, 1997.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 81-124, 2005.

CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 263p. 2005.

CENSO AGROPECUÁRIO. Rio de Janeiro: IBGE, 1996.

CHOU, CHANG-HUNG, Roles of Allelopathy in Plant Biodeversity and Sustainable Agriculture. **Critical Reviews in Plant Sciences**. USA.v.18, n.5, p.609-630, 1999.

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P.E.; SISLER, H.D. (Ed.) **Modern Fungicides and Antifungal Compounds**. Andover: Intercept, p. 461-466, 1996.

CORNELISSEN, B.J.C.; MELCHERS, L.S. strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p.709-712, 1993.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C.; COSTA, J.L.S.; BERNI, R.F. Diagnose de doenças. In: CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para o manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEPG, p.18-33, 1999.

DI PIERO, M. R.; PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopatologica**, v.30, p. 243-250, 2004.

DI PIERO, R.M.; GARCIA J.R.D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.29-50. 2005.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de feijão**. Piracicaba: Livrocere. 386p. 2007.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. Atheneu, 9ª edição, 307p. 1997.

FRIC, F. Oxidative enzymes. In: HEITEFUSS, R.; WILLIAMS, P.H. (ed.). **Physiological Plant Pathology**, Berlin: Springer, p. 617-631, 1976.

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

GUZZO, S.D., HAKAKAVA, R., KIDA, K., MARTINS, E.M.F., ROVERATTI, D.S. Proteção de cafeeiros contra *Hemileia vastatrix* por cloreto de benzalcônio (composto de amônio quaternário). **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 339-345, 1999.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.) **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, p.177-199, 1997.

HIJWEGWN, T.; VERHAAR, M.A.; ZADORKS, J.C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, v.45, p.631-635, 1996.

IBGE – **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v.24, n.12. 82p. 2011.

ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TOLENTINO Jr., J.B.; CRUZ, M.E.S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.1, p.75-83, 2009.

IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnopus sanguineus* no controle de ferrugem asiática em soja**. 117p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2009.

KIMATI, H. Controle Químico. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: ceres, 1995.

KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção. Tese de doutorado: ESALQ, 140p, 2007.

KUHN, O.J.; PORTZ, R.L.; STANGARLIN, J.R.; MONTALVÁN, R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. & FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.1, p.13-20, 2006.

MATTOS, L. **Marco referencial em agroecologia**. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, 70p. 2006.

MORAES, W. B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p. 175-190. 1992.

PASCHOLATI, S.F. 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**. Volume 1: Princípios e conceitos. 4ª edição Piracicaba: Ceres, p.593-633, 2011.

PAULA Jr., T.J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Eds). **Feijão: Aspectos gerais da cultura no Estado de Minas**: Viçosa: UFV, p. 375-433. 1998.

RAVA, C.A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Embrapa: Brasília, p.217-242. 1994.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 830p. 2010.

RESENDE, M.L.V.; MACHADO, J.C. **Manejo de doenças em pós-colheita de produtos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000.

RÖDER, C. **Controle alternativo de antracnose e podridão de *Rhizopus* na cultura do morango em pré-colheita**. Dissertação de Mestrado – Universidade estadual do Oeste do Paraná, 47p. 2006.

ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, p.411-429, 2008.

ROSOLEM, C.A.; MARUBAYASHI, O.M. Seja o doutor feijoeiro. **Encarte de Informações Agronômicas** - Nº 68. Potafós, arquivo do agrônomo, nº7, 1994.

SAITO, M.L; LUCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, série documentos 12, 46p. 1998.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, S.A.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Ed.) **A cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa do Potássio e do Fósforo, p. 669-722. 1996.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Doenças fúngicas da parte aérea. In: MOREIRA, J.A.A.; STONE, L.F.; BIAVA, M. **Feijão: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, p.128-139, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S.; Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28 (suplemento), p. 554-556, 2003.

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.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.125-138, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In.: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 1ª ed. p.227-247. 2008.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. Agrotóxicos: Aspectos gerais. In.: SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília, DF.: Embrapa Informação Tecnológica, p.17-73, 2004.

SINGH, R.; RAÍ, B. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Microbios**, v.102, p.165-173, 2000.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.11, p.16-21, 1999.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.34-42, 2000.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J. Evidência de custo adaptativo da resistência induzida por ASM e extratos de plantas medicinais em tomateiro fertirrigado. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.(supl.), p.1-3, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4ª ed. Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts, 794p. 2006.

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

VALE, F.X.R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) Controle de doenças. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, vol.1, p.335-423, 1997.

VIECELLI, C.A. Controle da mancha angular e análise bioquímica de resistência em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnopus sanguineus*. Marechal Cândido Rondon, Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Uniãoeste. p.61. 2008.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnopus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.2, p.81-90, 2009.

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.

VIECELLI, C.A.; MOREIRA, G.C. **Homeopatia no controle de doenças em plantas**. Cascavel: ASSOESTE, 98p. 2011.

VIEIRA, L.C.; HEMP, S. Taxonomia e morfologia do feijoeiro. In: **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis:EPAGRI, p.14-64, 1992.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 231p. 1998.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C.; VIEIRA, R.F. **Leguminosas graníferas**. Viçosa: UFV, 206p. 2001.

VIGO-SCHULTZ, S. C. Avaliação da indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijão vagem. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 78p. 2008.

YOKOYAMA, L.P. Cenários para a cultura. In: YOKOYAMA, L.P.; STONE, L.F. **Cultura do feijoeiro no Brasil: Características de produção**. Santo Antonio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, p.65-74, 2000.

YOKOYAMA, L.P.; STONE, L.F. Aspectos conjunturais da cultura. In: YOKOYAMA, L.P.; STONE, L.F. **Cultura do feijoeiro no Brasil: Características de produção**. Santo Antonio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, p.9-29, 2000.

4 CAPÍTULO I - FORMULAÇÃO DE EXTRATO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*) PARA O CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM FEIJOEIRO

RESUMO

Doenças do feijoeiro como a mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) e o crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) exigem um manejo que atualmente está respaldado em controle químico, comprometendo a saúde humana e o equilíbrio do ecossistema. Com o objetivo de desenvolver um produto alternativo aos químicos, formulou-se extrato seco de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e realizou-se testes de estabilidade acelerada, atividade antimicrobiana direta, efeitos sobre o desenvolvimento vegetativo e eficiência na redução da severidade dessas doenças. Foram usadas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, além da testemunha água, fungicida (azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹) para os ensaios com mancha angular e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para o crestamento bacteriano comum. O melhor resultado foi testado a campo. Os resultados indicam que a validade do extrato seco de alecrim é de 24 meses. *In vitro*, os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana direta sobre *P. griseola*, mas todas as concentrações inibiram a multiplicação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em até 100% na concentração de 50 mg L⁻¹. Os extratos secos de alecrim tenderam a incrementar a massa fresca e seca da parte aérea e da raiz do feijoeiro. Todas as concentrações reduziram a severidade da mancha angular, ao passo que para o crestamento bacteriano comum a concentração de 150 mg L⁻¹ apresentou maior controle. A campo, a concentração de 150 mg L⁻¹ que se apresentou eficiente na redução da doença em ambos os patossistemas, reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e incrementou a produtividade (Kg ha⁻¹) quando realizado uma aplicação aos 14 dias após a semeadura, em plantas desafiadas com mancha angular, e três aplicações para o crestamento bacteriano comum. Os resultados demonstram a eficiência do extrato seco de alecrim como alternativa ecologicamente correta para o controle das doenças citadas.

Palavras-chave adicionais: Indução de resistência, Lamiaceae, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudocercospora griseola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

4 CAPÍTULO I - FORMULATION OF ROSEMARY EXTRACT (*Rosmarinus officinalis*) FOR ALTERNATIVE CONTROL OF BEAN DISEASES

ABSTRACT

Bean diseases as angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola*) and bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) require a management that is currently supported on chemical control, damaging human health and the balance of the ecosystem. In order to develop an alternative product, it was formulated a dry extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) which has been submitted to accelerated stability tests, antimicrobial activity, effects on plant growth and efficiency in reducing the severity of these disease. It were used concentrations of 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹, and the control with water, fungicide (azoxystrobin was 40 mg L⁻¹) for assays with angular leaf spot and antibiotic (22.5 mg L⁻¹ oxytetracycline + 225 mg L⁻¹ streptomycin) to bacterial blight. The best result was field tested. The results showed that the validity of the dry extract of rosemary is 24 months. *In vitro*, the extracts showed no antimicrobial activity on *P. griseola*, but all concentrations inhibited the multiplication of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* up to 100% at concentration of 50 mg L⁻¹. The dried extracts of rosemary tended to increase the fresh and dry mass of shoots and roots of beans. All concentrations reduced the severity of angular leaf spot, whereas for the bacterial blight concentration of 150 mg L⁻¹ showed greater control. In the field, the concentration of 150 mg L⁻¹, which showed to be efficient in reducing disease in both pathosystems, reduced the area under the disease progress curve (AUDPC) and increased productivity (kg ha⁻¹) when was spraying at 14 days after planting in plants challenged with angular leaf spot, and three spraying for common bacterial blight. The results demonstrate the efficiency of dry extract of rosemary and shows itself as environmentally alternative for the control of these diseases.

Keywords: Induced resistance, Lamiaceae, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudocercospora griseola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

4.1 INTRODUÇÃO

*“Alecrim, alecrim dourado
Que nasceu no campo
Sem ser semeado
Foi meu amor,
Que me disse assim:
Que a flor do campo,
é o alecrim.”*

Canção Folclórica Brasileira

O controle alternativo de doenças de plantas vem merecendo atenção pela necessidade de reduzir a agressão química ao meio ambiente e ao homem (ASSIS, 2005). Nesse contexto, culturas de alto valor econômico e social como o feijoeiro (FERREIRA et al., 2006), destacam-se nas pesquisas que visam relatar um controle alternativo aos químicos por meio da indução de resistência das plantas em importantes patossistemas, como a mancha angular (VIECELLI et al., 2009; 2010) e o crestamento bacteriano comum (TOILLIER et al., 2010), doenças incidentes em todas as regiões onde se cultiva feijoeiro (FANCELLI & DOURADO NETO, 2007). A resistência nas plantas pode ser induzida pela aplicação exógena de produtos químicos, físicos (PASCHOLATI, 2011) ou naturais como os óleos essenciais e extratos de plantas medicinais (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN & CRUZ, 2003; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005), com capacidade de ativar mecanismos estruturais e bioquímicos de defesa aos patógenos (PASCHOLATI, 2011).

Nos últimos anos muitos extratos de plantas vêm sendo estudados e utilizados para o controle de doenças de plantas (STANGARLIN; KUHN & SCHWAN-ESTRADA, 2008) devido à presença de substâncias presentes no tecido destas que podem apresentar ação biológica direta contra os patógenos ou induzir resistência nas plantas em que são aplicados.

Os indutores de resistência apresentam efeitos protetores que podem durar por toda a vida da planta, protegendo-a contra um amplo espectro de fitopatógenos (PASCHOLATI, 2011). Podem agir somente no local aplicado ou a distância do mesmo (MORAES, 1992). Essas características são dependentes do tipo de agente indutor e do patossistema estudado.

Entre os indutores não convencionais, cita-se com potencial para o controle de doenças em feijoeiro, extratos da planta medicinal alecrim (*Rosmarinus officinalis*

L.) (VIGO-SCHULTZ, 2008; BRAND et al., 2010; ARSLAN, ILHAN & KARABULUT, 2009). O alecrim é uma planta da família Lamiaceae, perene, arbusto aromático, muito ramificado (CORRÊA Jr.; MING & SCHEFFER, 1994), chegando até a 1,8 m de altura (RIBEIRO & DINIZ, 2008). Originária da Europa possui como propriedades químicas os óleos essenciais, borneol, acetato de bornila e alfa pireno, dextrogina, canfeno, cânfora, eucaliptol, saponina, ácidos orgânicos, flavonóides e ácido nicotínico. O óleo essencial obtido das folhas é constituído principalmente de timol (50 – 60%) e carvacrol (5 – 8%), acompanhado de *p*-cimeno (12 – 27%), *cis*-cariofileno (1 – 10%), *γ*-terpineno (6%), mirceno (2%) e outros terpenos em menores quantidades. O timol é antimicrobiano, destacando-se sua atividade contra espécies de *Penicillium*. O carvacrol é antifúngico e anti-helmíntico usado na veterinária (TESKE & TRENTINI, 1997).

As partes do alecrim utilizadas na medicina popular são as folhas, talos e flores secas ou frescas, destinando-se para xampu, loção, banho e chás (RIBEIRO & DINIZ, 2008), sendo indicado como estimulante digestivo, azia, problemas respiratórios, debilidade cardíaca, cansaço físico e mental, hemorróidas, antiespasmódico e cicatrizante (MARTINS et al., 2000). Devido a alta capacidade antioxidante, pode ser adicionado em embutidos para aumentar o período de conservação. O uso abusivo do alecrim pode causar alterações no sono, nefrites e aumento do fluxo menstrual (RIBEIRO & DINIZ, 2008). A importância do alecrim é citada até mesmo na canção folclórica brasileira, revelando um pouco da vida e dos costumes do campo perante essa planta medicinal.

No controle de doenças em plantas, o alecrim é relatado por Röder et al. (2007), no controle da podridão causada por *Colletotrichum* sp. em frutos de morango e por Itako et al. (2009) pela eficiência na redução da severidade de cladosporiose (*Cladosporium fulvum*) em folhas de tomateiro. Testes *in vitro* com óleo essencial de alecrim também se mostram promissores no controle de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, responsável pelo crestamento bacteriano comum em feijão vagem cultivar Bragança (VIGO-SCHULTZ, 2008) e *Ralstonia solanacearum*, bactéria causadora da murcha em plantas de pimentão (MARTINS et al., 2010).

Assim, o conhecimento empírico do alecrim para uso medicinal e os resultados significativos no controle de doenças em plantas, constituíram o objetivo desse trabalho em desenvolver um extrato, com determinação da validade, recomendações técnicas e eficiência no controle de fitopatógenos

Pseudocercospora griseola, causador da mancha angular e de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, responsável pelo cretamento bacteriano comum, ambos em feijoeiro.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção e manutenção de *P. griseola*

O isolado de *P. griseola* foi obtido a partir de lesões em folhas de feijoeiro naturalmente infectadas, coletadas na lavoura da Fazenda Escola da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, Paraná. realizou-se isolamento direto do fungo o qual foi cultivado em meio de suco de tomate (200 mL de suco de tomate integral + 15 g de ágar + 4,5 g de CaCO₃ + 800 mL de água destilada), por 14 dias a temperatura de 24 °C com escotofase total (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000).

4.2.2 Obtenção e manutenção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

O isolado da bactéria *X. axonopodis* pv *phaseoli* foi obtido de folhas de feijoeiro infectadas naturalmente com a doença, provenientes da lavoura da Fazenda Escola da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, Paraná. O isolamento foi realizado com fragmentos da folha (0,5 cm) na área de transição tecido sadio e tecido doente, o qual foi imerso em álcool 50% por 30 segundos, em seguida em hipoclorito de sódio (1%) por 1 min e, posteriormente, em água destilada. Após esta desinfestação superficial, foi realizada a maceração em solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada e então, com alça de platina, transferida uma alíquota do macerado para placas de Petri contendo meio ágar-nutriente, realizando-se estrias compostas. Em seguida, as placas foram identificadas, invertidas e incubadas a 25 °C, observando-se seu crescimento após 48 h (MARIANO & SILVEIRA, 2000).

A curva de crescimento bacteriano foi obtida pelo método de determinação da concentração do inóculo pela contagem em placas, descrito por Mariano & Assis (2000). Foi preparada uma suspensão da bactéria teste a partir da cultura em placas com 48 h de incubação. Foram ajustadas concentrações bacterianas para obter leituras de absorbância a 560 nm de 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,0. Cada uma das suspensões foi diluída até 10⁷, 10⁸ e 10⁹.

Foi pipetado 1 mL de cada diluição e espalhado uniformemente com alça de vidro flambada e esfriada em placas de Petri com meio ágar-nutriente, preparando-

se quatro placas para cada diluição, as quais foram invertidas e incubadas a 25 °C por 48 h. Foi obtida pelo menos uma série de placas contáveis (que apresentasse entre 30 a 300 colônias) para cada absorbância. Os dados de unidades formadoras de colônia (UFCs) foram transformados para uma mesma base de 10^{10} , obtendo-se, posteriormente uma equação de regressão.

Para a definição da concentração da suspensão bacteriana foi efetuado o cálculo: $\text{UFC mL}^{-1} = \text{número médio de colônias} \times \text{diluição da amostra}$. Os dados de concentração (UFC) foram transformados para uma mesma base de 10^{10} , obtendo-se, posteriormente uma equação de regressão.

4.2.3 Formulação e determinação da validade do extrato de *R. officinalis*

As folhas de alecrim foram coletadas no horto medicinal da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e posteriormente submetidos a lavagem e secagem em papel toalha do material. Em seguida, as folhas de alecrim foram trituradas com água destilada em liquidificador durante 2 minutos, na proporção de 300 g de folha para 900 mL de água destilada, ou seja, a 33,3%, sendo esta a máxima concentração que permitiu uma uniforme trituração. Após, filtrou-se o extrato em uma peneira de controle granulométrico de 48 mesh e o bagaço retido nessa peneira foi prensado em pano e juntado ao extrato filtrado para melhor aproveitamento do mesmo. O extrato aquoso obtido na filtração com a peneira de 48 mesh foi novamente filtrado em uma peneira de 200 mesh, sendo o bagacilho retido na peneira descartado e o extrato filtrado final foi coletado, determinado o teor de sólidos solúveis e em seguida procedida a secagem.

O teor de sólidos solúveis foi determinado pela adição de 5 gotas do extrato aquoso filtrado de alecrim no refratômetro do tipo ABBE. Após a verificação, procedeu-se a secagem do extrato em um atomizador (Spray Dryer) de bancada que utiliza ar comprimido e energia elétrica como fonte geradora de calor. A temperatura de entrada no atomizador era de 175°C e na saída 105°C. O tempo de secagem foi de uma hora e quarenta e cinco minutos, com rendimento de 10,5 gramas a partir de 700 mL de extrato aquoso filtrado de alecrim, com 1,7% de teor de sólidos solúveis.

O extrato seco obtido foi rapidamente acondicionado em envelopes impermeáveis e lacrados em seladora manual. Posteriormente, parte dessas amostras foram mantidas em temperatura ambiente e protegidas do sol para a determinação da eficiência *in vitro* e *in vivo* dos extratos sobre *P. griseola* e *X.*

axonopodis pv. *phaseoli*. Outra parte das amostras foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada, mantendo-as em estufa a 40 °C por até seis meses e a cada dois meses uma amostra foi retirada da estufa e mantidas a temperatura ambiente até completar seis meses e posteriormente esse extrato seco foi diluído em água destilada nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, para realização dos testes *in vitro* e *in vivo* com os patógenos para determinação do tempo de prateleira, conforme norma da ANVISA, por meio da resolução - RE n° 398, de 12 de novembro de 2004, publicada no Diário Oficial da União de 16 de novembro de 2004, a qual determina que, se o produto não apresentar alteração no efeito após os 6 meses na estufa, atribui-se 24 meses de validade.

4.2.4 Testes *in vitro* para determinação da validade do extrato de *R. officinalis*

4.2.4.1 Inibição da germinação de esporos

Para *P. griseola* o teste foi realizado em lâmina de microscopia revestida por fina camada de ágar-água a 1% (1000 µL por lâmina). Alíquotas de 40 µL do extrato seco de alecrim sob estabilidade acelerada com 0, 2, 4 e 6 meses na estufa a 40 °C, ajustadas para obter concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e alíquotas de 40 µL da suspensão de conídios de *P. griseola* (1x10⁴ conídios mL⁻¹) obtidos de cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida com escotofase total a 24 °C. A porcentagem de germinação foi determinada 24 h após o início do experimento com a adição de 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação dos conídios (STANGARLIN et al., 1999).

4.2.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana

Para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparado meio de cultura caldo nutriente (extrato de carne: 3 g; peptona: 5 g; glicose: 15 g; água destilada: 1.000 mL) (MARIANO & SILVEIRA, 2000). O meio de cultura (10 mL tubo⁻¹) recebeu as diferentes concentrações do extrato seco de alecrim sob estabilidade acelerada em 0, 2, 4 e 6 meses na estufa a 40°C, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, e posteriormente foram esterilizados em autoclave. Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células bacterianas contendo 10¹⁰ UFC mL⁻¹ foi adicionada a cada tubo, os quais foram incubados a 28° C por 48h em estufa incubadora sob agitação

a 150 rpm. A avaliação do número de bactérias foi realizada por espectrofotometria, anotando-se a absorbância a 560 nm de cada amostra e calculando-se o valor de UFCs de acordo com a curva de crescimento bacteriano previamente elaborada.

4.2.5 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de *R. officinalis*

4.2.5.1 Cultivo e manutenção em casa de vegetação

Os ensaios foram conduzidos em cultivo protegido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712 m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S.

Cinco plantas de feijoeiro (cultivar IAPAR 81 – Carioca) foram cultivadas em vasos plásticos, contendo 20 L de substrato com solo, areia e matéria orgânica (proporção 2:1:1). Cada tratamento foi composto por cinco vasos, os quais representavam as repetições. Não se realizou adubação devido a análise de solo apresentar resultados satisfatórios de nutrientes.

4.2.5.2 Aplicação dos extratos com estabilidade acelerada

Aplicou-se os tratamentos com os extratos secos de alecrim submetidas a 0, 2, 4 e 6 meses na estufa a 40°C para atribuir a estabilidade acelerada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, adicionando-se 0,25% de adjuvante natural (obtido da trituração de 100 g de linhaça hidratada com 1L de vinagre de vinho natural, e mantido a temperatura ambiente e no escuro por 20 dias), metodologia informada por Márcia Vargas Toledo – EMATER - Comunicação pessoal. Os tratamentos foram aplicados por aspersão com auxílio de um borrifador manual de pressão acumulada, na 3ª folha (fase vegetativa V4) em quantidade de 1 mL por folha.

4.2.5.3 Inoculação de *P. griseola* em casa de vegetação

A suspensão de conídios de *P. griseola* foi preparada em água com Tween 20 (uma gota 500 mL⁻¹) a partir da raspagem com pincel de uma colônia com 14 dias de idade, sendo a concentração ajustada para 4x10⁴ conídios mL⁻¹. A inoculação em casa de vegetação foi realizada com borrifador manual de pressão acumulada aos três dias após a aplicação dos extratos secos de alecrim com estabilidade

acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada (fase vegetativa V4). A inoculação foi realizada no início da noite para que as plantas permanecessem no escuro para garantir a infecção e mantidas à temperatura ambiente (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000).

4.2.5.4 Inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em casa de vegetação

A suspensão bacteriana com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparada com solução salina (0,85% de NaCl) a partir de um isolado com 48 h de cultivo e ajustada na concentração de 5×10^7 UFC mL⁻¹ (RAVA & SARTORATO, 1994). Foram inoculadas com auxílio de um borrifador manual de pressão acumulada aos três dias após a aplicação dos tratamentos com extratos secos de alecrim sob estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada. A inoculação foi realizada no início da noite e as plantas mantidas à temperatura ambiente.

4.2.5.5 Avaliação da severidade para determinação da validade

A severidade da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro em casa de vegetação foi avaliada na 3ª e 4ª folha aos 21 dias após a inoculação. Estas folhas foram destacadas e escaneadas para determinação da área lesionada com o auxílio do sistema computacional QUANT v. 1.0.2 (VALE, FERNANDES FILHO & LIBERATO, 2003).

4.2.6 Testes *in vitro* para determinação da eficiência do extrato de *R. officinalis*

4.2.6.1 Inibição da germinação de esporos

Para *P. griseola* o teste foi realizado em lâmina de microscopia revestida por fina camada de ágar-água a 1% (1000 µL por lâmina). Alíquotas de 40 µL do extrato seco de alecrim que não foi submetido a estabilidade acelerada (mantidos em temperatura ambiente), ajustadas para se obter as concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e alíquotas de 40 µL da suspensão de conídios de *P. griseola* (1×10^4 conídios mL⁻¹) obtidos de cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida com escotofase total a 24 °C. A porcentagem de germinação foi determinada 24 h após o início do experimento com a adição de 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada

lâmina, a fim de paralisar a germinação dos conídios (STANGARLIN et al., 1999). Como controles utilizaram-se água, fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e água com 0,25% de adjuvante natural.

4.2.6.2 Inibição da multiplicação bacteriana

Para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparado meio de cultura caldo nutriente (MARIANO & SILVEIRA, 2000). O meio de cultura (10 mL tubo⁻¹) recebeu as diferentes concentrações do extrato seco de alecrim que não foi submetido a estabilidade acelerada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e posteriormente foram esterilizados em autoclave. Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células bacterianas contendo 10¹⁰ UFC mL⁻¹ foi adicionada a cada tubo, os quais foram incubados a 28°C por 48h em estufa incubadora sob agitação a 150 rpm. A avaliação do número de bactérias foi realizada por espectrofotometria, anotando-se a absorbância a 560 nm de cada amostra e calculando-se o valor de UFCs de acordo com a curva de crescimento bacteriano previamente elaborada. Como tratamentos controles utilizaram-se apenas o meio de cultura, antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e o meio de cultura com 0,25% de adjuvante natural.

4.2.7 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de *R. officinalis*

4.2.7.1 Cultivo em casa de vegetação

Os ensaios foram conduzidos em cultivo protegido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712 m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S.

Cinco plantas de feijoeiro (cultivar IAPAR 81 – Carioca) foram cultivadas em vasos plásticos, contendo 20 L de substrato com solo, areia e matéria orgânica (proporção 2:1:1). Cada tratamento foi composto por cinco vasos, os quais representavam as repetições. Não se realizou adubação devido a análise de solo apresentar resultados satisfatórios de nutrientes.

4.2.7.2 Aplicação dos tratamentos em casa de vegetação

Aplicou-se os tratamentos com os extratos secos de alecrim não submetidas a estabilidade acelerada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, e os controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crestamento bacteriano comum. Nos extratos e no controle água foram adicionados 0,25% de adjuvante natural. Os tratamentos foram aplicados por aspersão utilizando um borrifador de pressão acumulada na 3ª folha trifoliolada (fase vegetativa V4), em quantidade de 1 mL por folha. No momento da aplicação as demais folhas foram protegidas com sacos plásticos.

4.2.7.3 Inoculação de *P. griseola* em casa de vegetação

A suspensão de conídios de *P. griseola* foi preparada em água com Tween 20 (uma gota 500 mL⁻¹) a partir de uma colônia com 14 dias de idade, sendo a concentração ajustada para 4x10⁴ conídios mL⁻¹. A inoculação em casa de vegetação foi realizada três dias após a aplicação dos extratos secos de alecrim não submetidos a estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada (fase vegetativa V4). A inoculação foi realizada no início da noite para que as plantas permanecessem no escuro para garantir a infecção e mantidas à temperatura ambiente (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000).

4.2.7.4 Inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em casa de vegetação

A suspensão bacteriana com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparada com solução salina (0,85% de NaCl) a partir de um isolado com 48 horas e ajustada na concentração de 5 x 10⁷ UFC mL⁻¹ (RAVA & SARTORATO, 1994). Foram inoculadas três dias após a aplicação dos tratamentos com extratos secos de alecrim não submetidos a estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada. A inoculação foi realizada no início da noite e as plantas mantidas à temperatura ambiente.

4.2.7.5 Avaliação da severidade para determinação da eficiência

A severidade da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro em casa de vegetação foi avaliada na 3ª e 4ª folha aos 21 dias após a

inoculação, por determinação da área lesionada com o auxílio do sistema computacional QUANT v. 1.0.2 (VALE, FERNANDES FILHO & LIBERATO, 2003).

4.2.8 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro em casa de vegetação

4.2.8.1 Avaliação de crescimento de parte aérea e raiz

Para o teste de avaliação do desenvolvimento de plantas de feijoeiro, aplicou-se os extratos secos de alecrim nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e os controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) aos 20 dias após o plantio. Aos 50 dias coletaram-se as plantas, separando parte aérea da raiz para pesagem do material fresco, sendo posteriormente seco em estufa a 104 °C por 24 horas para avaliação da massa seca. Para este teste não se inoculou os patógenos.

4.2.9 Testes a campo para determinação da eficiência do extrato de *R. officinalis*

4.2.9.1 Cultivo a campo

O cultivo a campo foi conduzido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S. As plantas de feijoeiro (IAPAR 81 – Carioca) foram semeadas em 16 de fevereiro de 2011 para o experimento 1 (época da seca) e em 19 de setembro de 2011 para o experimento 2 (época das águas) (SARTORATO et al., 1983), sendo realizado média dos experimentos 1 e 2 para avaliação da eficiência dos tratamentos.

Os experimentos constituíram-se de três blocos casualizados, sendo que cada bloco era composto por cinco parcelas, e cada parcela dentro de um bloco representava um tratamento. Cada tratamento foi constituído de área útil de quatro linhas de 1 m de comprimento cada, espaçadas 0,45 m entre si, com doze plantas viáveis por metro linear, constituindo uma densidade populacional de 266 mil plantas por hectare. A bordadura constava com 1 m anterior e posterior e duas linhas entre os tratamentos. Essa descrição de croqui foi aplicada tanto para a mancha angular como para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro.

Foram aplicados 400 kg ha⁻¹ de NPK (04-14-08) no sulco da semeadura (de acordo com análise de solo) e os demais tratos culturais como capinas foram

realizados sempre que necessário. No experimento 1 aplicou-se por aspersão em todos os tratamentos uniformemente, na fase vegetativa V5, um produto homeopático a base de percevejo fornecido pela COOPAVEL, diluindo-se 5 gotas em 1L de água. O controle de percevejo foi satisfatório a partir dessa aplicação, não sendo necessária outra forma de manejo.

4.2.9.2 Aplicação dos tratamentos a campo

Os tratamentos com os extratos secos de alecrim não submetidos ao teste de estabilidade acelerada foram realizadas com 1 (14 dias após a semeadura - DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações em toda a planta na concentração de 150 mg L⁻¹, além dos controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crestamento bacteriano comum. Nos extratos e no controle água foram adicionados 0,25% de adjuvante natural. O fungicida e o antibiótico foram aplicados três vezes ao longo do ciclo da cultura (aos 14, 28 e 42 DAS), conforme recomendação técnica do produto. Os tratamentos foram aplicados por aspersão em quantidade de 5 mL por planta.

Para o experimento com mancha angular, as plantas foram inoculadas com suspensão de esporos de *P. griseola* (4x10⁴ esporos mL⁻¹) preparada em água com Tween 20 (uma gota 500 mL⁻¹) a partir de uma colônia com 14 dias de idade (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000), e para o crestamento bacteriano comum, a suspensão bacteriana com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparada com solução salina (0,85% de NaCl) a partir de um isolado com 48 h e ajustada na concentração de 5 x 10⁷ UFC mL⁻¹ (RAVA & SARTORATO, 1994). Ambos os patógenos foram inoculados separadamente três vezes na cultura, aos 3 dias após a aplicação de cada tratamento.

4.2.9.3 Avaliação da severidade a campo

A severidade da doença a campo foi avaliada em toda a planta, iniciando aos 7 dias após a última inoculação, com escala diagramática elaborada por Godoy et al. (1997) para a mancha angular (*P. griseola*) e escala descrita por Díaz, Bassanezi & Bergamin Filho (2001) para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*).

Foram realizadas quatro avaliações a cada quatro dias e, posteriormente, procedeu-se ao cálculo da curva de progresso da doença e a determinação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para ambas as doenças, por meio da equação proposta por Campbell & Madden (1990):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i) \right]$$

n = número de avaliações;

y = intensidade da doença na i-ésima avaliação;

t = tempo no momento da i-ésima.

4.2.9.4 Avaliação da produtividade a campo

Ao final do ciclo da cultura, foram coletados dados de massa e número de grãos por planta, número de vagens e número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produtividade em Kg ha⁻¹. A umidade foi verificada e o teor ajustado para 13% em todos os tratamentos.

4.2.10 Análise estatística

4.2.10.1 Análise estatística dos testes para determinação da validade

O delineamento experimental *in vitro* e em casa de vegetação foi organizado em esquema fatorial 4x4 (quatro tempos de estabilidade acelerada a 40°C do extrato seco de alecrim (0; 2; 4 e 6 meses) x 4 concentrações (50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹). Foram utilizados *in vitro* três repetições e em casa de vegetação cinco repetições.

Os dados foram expressos em porcentagem e transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$. As análises de variância (ANAVA) foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). A comparação das médias dos tratamentos foi realizada com a aplicação do teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. A classificação dos valores do coeficiente de variação (C.V.) foi determinada de acordo com Pimentel Gomes (2000), sendo estes considerados baixos até 10%, médios entre 10 e 20%, altos entre 20 e 30% e muito altos acima de 30%.

4.2.10.2 Análise estatística dos testes para determinação da eficiência

Para avaliação do efeito dos extratos secos de alecrim não submetidos a estabilidade acelerada, o delineamento experimental *in vitro* foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos, sendo o extrato nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e os controles água, adjuvante natural e fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para a germinação de esporos de *P. griseola* e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para multiplicação bacteriana de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, com três repetições cada.

Em casa de vegetação o delineamento inteiramente casualizado apresentava as concentrações do extrato de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e os controles água e fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crestamento bacteriano comum, e ambos para a variável de crescimento, com cinco repetições cada tratamento.

A campo, o delineamento foi organizado em blocos casualizados com cinco tratamentos: extrato seco de alecrim a 150 mg L⁻¹, aplicados 1, 2 e 3 vezes e os controles água e fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crestamento bacteriano comum, ambos com cinco parcelas, sendo que a parcela representava a repetição.

Os dados expressos em porcentagem foram transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. As análises de variância (ANAVA) foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). A comparação das médias dos tratamentos foi realizada com a aplicação do teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Determinação da validade do extrato de *R. officinalis*

4.3.2 Testes *in vitro* para determinação da validade do extrato de *R. officinalis*

4.3.2.1 Inibição da germinação de esporos

A análise de variância do efeito do extrato seco de alecrim sob estabilidade acelerada por 0, 2, 4 e 6 meses a 40° C na estufa, foi significativo apenas para a

concentração de 50 mg L⁻¹, que aos 6 meses reduziu a germinação de esporos de *P. griseola*. As demais concentrações se mantiveram estáveis (Tabela 4.1). Assim, sugere-se trabalhar com concentrações a partir de 100 mg L⁻¹, e com o tempo de prateleira estimado para o teste *in vitro* ao fungo *P. griseola*, de até 24 meses.

Tabela 4.1: Germinação de esporos de *P. griseola* em função dos tratamentos com extratos secos de *R. officinalis* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.

Tempo (meses)	Germinação de esporos (%)				Média
	50 mg L ⁻¹	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	
0 ^{ns}	86,3b	84,3	71,3	80,6	80,6
2 ^{ns}	84,0b	82,6	75,6	77,3	79,8
4 ^{ns}	81,0b	70,6	85,0	80,6	79,3
6	63,6Aa	71,3AB	80,6B	79,0B	73,6
Média	78,7	77,2	78,1	79,3	78,3
C. V. (%) = 8,97					

Média seguida de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, difere pelo teste de Tukey a 5%. Tratamento seguido de ns indica não significância estatística. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$.

4.3.2.2 Inibição da multiplicação bacteriana

O extrato seco de alecrim sob estabilidade acelerada por 0, 2, 4 e 6 meses a 40° C na estufa, apresentou diferença significativa (Tabela 4.2), sendo que a concentração de 50 mg L⁻¹ estimulou a multiplicação bacteriana (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) aos 6 meses.

Tabela 4.2: Multiplicação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em função dos tratamentos com extratos secos de *R. officinalis* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.

Tempo (meses)	Concentração bacteriana (UFC mL ⁻¹ x10 ¹⁰)				Média
	50 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	150 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹	
0	19,6 Aa	34,6 Aab	100,0 Bb	107,6 Bab	65,5
2 ^{ns}	16,6 a	19,0 a	20,3 a	58,6 a	28,6
4	13,3 Aa	76,3 Bb	37,0 BCa	134,0 Cb	65,1
6	94,3 ABb	55,3 Aab	130,6 Bb	62,3 Aa	85,6
Média	36,0	46,3	72,0	90,6	61,2
C. V. (%) = 40,8					

Média seguida de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, difere pelo teste de Tukey a 5%. Tratamento seguido de ns indica não significância estatística.

As concentrações de 100 e 200 mg L⁻¹ não diferiram do extrato que não foi submetido a estabilidade acelerada e para a de 150 mg L⁻¹ houve inibição da multiplicação aos 2 e 4 meses, não diferenciando do tempo 0 aos 6 meses.

Quando se analisa as linhas da Tabela 4.2, observa-se que no geral as menores concentrações inibiram a multiplicação da bactéria. No entanto sugere-se trabalhar com doses acima de 100 mg L⁻¹, devido a estabilidade perdurar por até 24 meses.

4.3.3 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de *R. officinalis*

4.3.3.1 Avaliação da severidade de *P. griseola*

A análise de variância do efeito do extrato seco de alecrim submetido a estabilidade acelerada, sobre a severidade da mancha angular na terceira folha, tratada e inoculada com *P. griseola*, não foi significativa (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Severidade da mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extrato seco de *R. officinalis* submetido ao processo de estabilidade acelerada.

Severidade (%) 3ª Folha					
Tempo (meses)	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	Média
0 ^{ns}	0,5	0,5	0,4	0,9	0,5
2 ^{ns}	0,9	1,0	0,5	0,6	0,7
4 ^{ns}	0,6	0,4	0,3	0,8	0,5
6 ^{ns}	0,7	0,4	0,5	0,9	0,6
Média	0,6	0,5	0,4	0,8	0,57
C. V. (%) = 37,07					
Severidade (%) 4ª Folha					
Tempo (meses)	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	Média
0 ^{ns}	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
2 ^{ns}	0,08	0,1	0,1	0,03	0,07
4 ^{ns}	0,04	0,1	0,2	0,1	0,1
6 ^{ns}	0,1	0,1	0,2	0,08	0,1
Média	0,1	0,1	0,1	0,07	0,09
C. V. (%) = 96,35					

Tratamento seguido de ns indica não significância estatística. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$. Ensaio realizado em casa de vegetação. Tratamentos aplicados na 3ª folha três dias antes da inoculação com *P. griseola*, que ocorreu na 3ª e 4ª folha.

Assim, o extrato mostra-se estável em todas as concentrações durante os seis meses de incubação, confirmando sua validade por 24 meses. O mesmo pode ser observado para a 4ª folha (apenas inoculada com *P. griseola*).

4.3.3.2 Avaliação da severidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

Para a severidade do crestamento bacteriano comum em feijoeiro, avaliado na terceira folha tratada e inoculada, o extrato seco de alecrim se mostrou estável durante os seis meses do teste de estabilidade acelerada. Porém, o desdobramento do fatorial demonstra que as concentrações de 100 e 150 mg L⁻¹ foram mais eficientes na redução da severidade, quando comparados com 50 e 200 mg L⁻¹, sugerindo, dessa forma, tempo de validade do extrato de 24 meses e testes a campo com concentrações entre 100 e 150 mg L⁻¹ (Tabela 4.4).

Para a 4ª folha, apenas inoculada, verifica-se o efeito sistêmico dos tratamentos durante os seis meses sobre a severidade do crestamento bacteriano em feijoeiro. O desdobramento do fatorial de tempo e das concentrações revelam que o efeito sistêmico apresenta-se de forma significativa, com redução da severidade a partir da concentração de 100 mg L⁻¹, quando comparados a 50 mg L⁻¹ que apresentou maior severidade da doença. Portanto os dados confirmam a validade do extrato seco de alecrim por 24 meses.

Os resultados obtidos com desdobramento do fatorial dos extratos secos de alecrim submetidos a estabilidade acelerada, sugerem maior constância na concentração de 150 mg L⁻¹ quando testados para a mancha angular (*P. griseola*) e para o crestamento bacteriano comum (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) do feijoeiro, tanto nos testes *in vitro* como *in vivo*. Destaca-se que para ambas as doenças a validade do extrato de alecrim é de 24 meses. Na literatura não constam trabalhos de estabilidade acelerada com extratos de plantas medicinais, contudo, essa validade relativamente longa do extrato seco de alecrim pode estar associada a características antioxidantes presentes no formulado, uma vez que a planta apresenta alto conteúdo de princípios antioxidantes, conforme comentam Velloso & Peglow (2003).

Tabela 4.4: Severidade do crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extrato seco de *R. officinalis* submetido ao processo de estabilidade acelerada.

Tempo (meses)	Severidade (%) 3° Folha				Média
	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	
0	14,2 B	8,7 AB	5,5 A	12,8 B	10,3
2	13,7 B	8,8 AB	4,3 A	10,8 B	9,4
4	12,4 B	5,9 A	4,5 A	9,3 AB	8,0
6	12,2 B	6,8 A	3,8 A	9,6 AB	8,1
Média	13,1	7,5	4,5	10,6	8,96
C. V. (%) = 31,48					
Tempo (meses)	Severidade (%) 4° Folha				Média
	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	
0	5,4 B	3,0 AB	0,4 A	1,0 A	2,4
2	5,2 B	2,3 A	0,4 A	0,7 A	2,1
4	3,7 B	2,9 AB	0,5 A	0,7 A	1,9
6	3,9 B	1,6 AB	1,5 AB	0,4 A	1,8
Média	4,5	2,4	0,7	0,7	2,10
C. V. (%) = 55,93					

Média seguida de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, difere pelo teste de Tukey a 5%. Tratamento seguido de ns indica não significância estatística. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. Ensaio realizado em casa de vegetação. Tratamentos aplicados na 3ª folha três dias antes da inoculação com *P. griseola*, que ocorreu na 3ª e 4ª folha.

4.3.4 Testes *in vitro* para determinação da eficiência do extrato de *R. officinalis*

4.3.4.1 Inibição da germinação de esporos

A análise de variância do efeito do extrato aquoso seco de alecrim não mantido em estabilidade acelerada, apresentou-se significativo sobre a germinação de esporos de *P. griseola* (Figura 4.1). A concentração de 150 mg L⁻¹ do extrato seco de alecrim e o adjuvante natural não diferiram dos demais tratamentos. As concentrações do extrato não diferiram da testemunha água, mas diferiram do fungicida, exceto para 150 mg L⁻¹. O adjuvante natural não diferiu da testemunha água, podendo utilizá-lo nos testes *in vivo*, acrescentando-o a calda para maximizar o efeito dos extratos devido a melhor aderência do na superfície cerosa da folha.

Resultados com padrão diferente de resposta *in vitro* do obtido neste trabalho, com extrato de alecrim sobre fungos fitopatogênicos, são descritos por Tagami et al. (2009), os quais observaram que os extratos brutos aquosos de alecrim (*R. officinalis*) apresentaram-se fungitóxicos sobre os fungos *Alternaria alternata*, *Colletotrichum graminicola*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, em testes *in vitro*. Da mesma forma, Pitarokili, Tzakou & Loukis (2008) observaram atividade antimicrobiana dos compostos químicos de alecrim sobre os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora nicotianae*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* e *Fusarium proliferatum*.

Para Itako et al. (2008), os extratos brutos aquosos de alecrim não interferiram no crescimento micelial de *Alternaria solani*, mas inibiram em 78,9% a esporulação a partir da concentração de 10% e a germinação de esporos em 59,5% na concentração de 20%. Contudo, inibições do crescimento micelial dos fitopatógenos *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. isolados de flores de *Gerbera* sp. e *Rosa* sp. são relatadas por Camatti-Sartori et al. (2011), utilizando extratos acéticos de alecrim na concentração de 25%, causando inibições de 40 e 90%, respectivamente.

Conforme Scapin et al. (2010), a partir da concentração de 1%, os extratos brutos aquosos de *R. officinalis*, *Artemisia camphorata* e *Achillea millefolium*, proporcionaram inibição do crescimento micelial de *Exserohilum turcicum*, fungo causador da helmintosporiose em milho pipoca, em 19, 14 e 12% respectivamente. Os maiores efeitos na inibição do fungo ocorreram na concentração de 40%, proporcionando controle no crescimento micelial de 54, 58, 38 e 27%, para *R. officinalis*, *A. camphorata*, *A. millefolium* e *Cymbopogon citratus* respectivamente.

Entretanto, o crescimento micelial de *Aspergillus niger* e *Aspergillus parasiticus* foi estimulado pelo óleo essencial de alecrim (SAGLAM, OZCAN & BOYRAZ, 2009), destacando a especificidade de ação dos compostos de alecrim sobre diferentes patógenos estudados.

Conforme os resultados *in vitro* descritos na literatura a partir do óleo essencial ou do extrato bruto aquoso de alecrim sobre fungos fitopatogênicos, percebe-se que a atividade antimicrobiana é específica para cada espécie de fungo, o que respalda que a eficiência desse extrato formulado de alecrim deste trabalho deve ser confirmada em testes *in vivo*, pois a eficácia não necessariamente depende da atividade fúngica direta, uma vez que o mesmo pode agir por indução de resistência na planta.

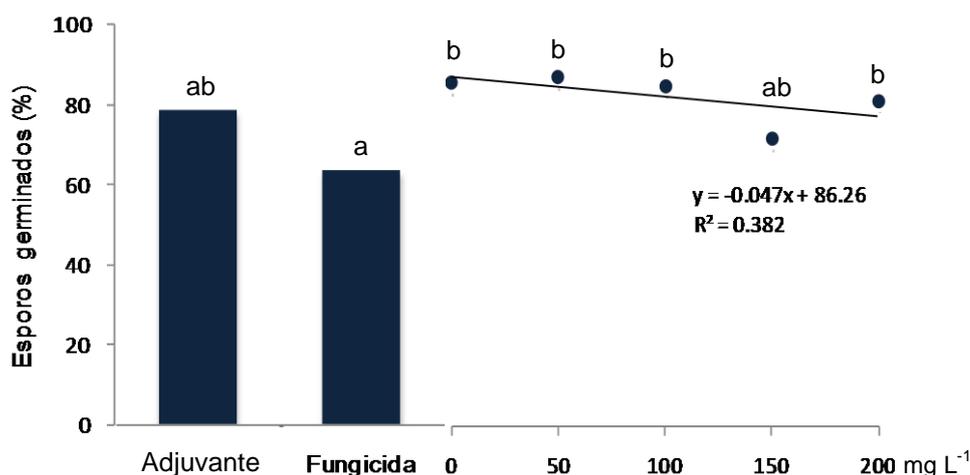


Figura 4.1: Percentual de germinação de esporos de *P. griseola* em função do tratamento com extratos secos de *R. officinalis* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$.

4.3.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana

Os extratos secos de alecrim apresentaram atividade antimicrobiana, inibindo em até 100% a multiplicação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* na concentração de 50 mg L⁻¹, quando comparado a testemunha água. Todas as concentrações foram estatisticamente iguais ao antibiótico. O adjuvante natural e a testemunha água não diferiram entre si, podendo se fazer uso deste na calda do extrato a ser aplicada a campo, visando aumentar a eficiência da aplicação pela melhor aderência do produto a superfície foliar (Figura 4.2).

Esses resultados corroboram com dados obtidos por Martins et al. (2009), os quais observaram que o óleo essencial de alecrim foi efetivo contra a bactéria *Ralstonia solanacearum*, agente causador da murcha bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), nas concentrações de 4 e 8%, em condições *in vitro*. Da mesma forma, Luqman et al. (2007) observaram que o óleo essencial de alecrim apresentou efeito inibitório sobre as bactérias *Mycobacterium smegmatis* e *Escherichia coli*, causadoras de doenças em humanos.

Resultado semelhante foi obtido por Vigo-Schultz (2008), que observou a presença de halos de inibição de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, responsável pelo crestamento bacteriano comum em feijão vagem cultivar Bragança, ao utilizar óleos essenciais de alecrim a partir da concentração de 1%. Para Martins et al. (2010), o

óleo de alecrim, na concentração de 4 e 8% foi ativo sobre os isolados RPAR1 e RPLS1 de *Ralstonia solanacearum*, bactéria causadora da murcha em plantas de pimentão, com valores médios dos halos de inibição entre 13 e 14 mm de diâmetro, respectivamente, verificando que a partir desta concentração o óleo essencial de alecrim não foi efetivo no controle *in vitro*.

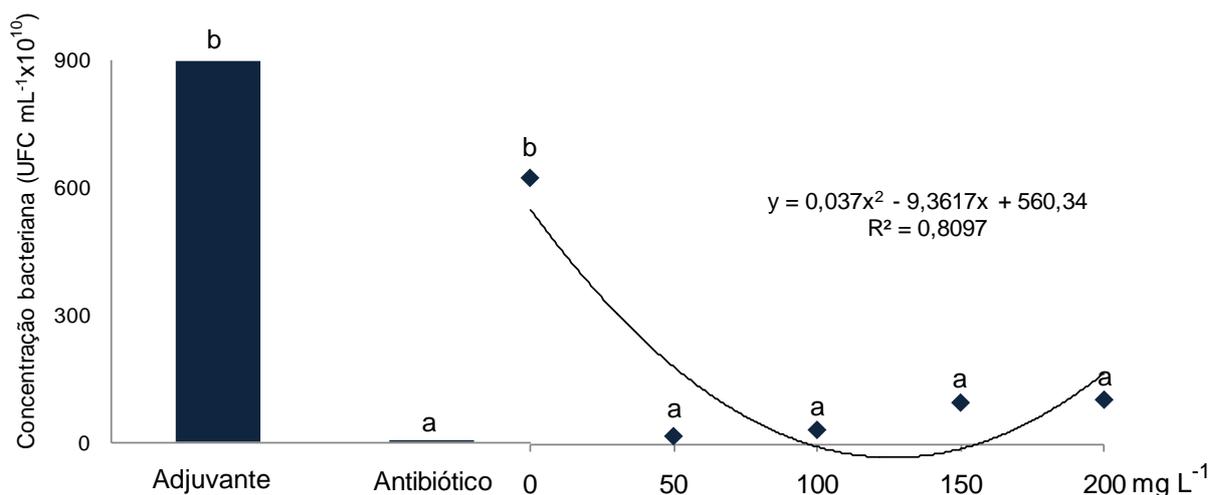


Figura 4.2: Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em função do tratamento com extratos secos de *R. officinalis* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%.

A atividade antimicrobiana do alecrim é confirmada também por Costa et al. (2008), os quais observaram que houve inibição da multiplicação bacteriana *in vitro* de *Erwinia carotovora* pelo óleo essencial de alecrim, na concentração de 4%, onde o halo apresentou diâmetros entre 25 e 28 mm, tendo uma efetividade maior do que o controle com a tetraciclina, cujos halos variaram entre 18 e 25 mm.

De acordo com os estudos *in vitro* descritos na literatura a partir do óleo essencial de alecrim, somado a atividade antimicrobiana do extrato seco desenvolvido neste trabalho que mantém-se ativa, sugere que a viabilidade da formulação do extrato contra a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

4.3.5 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de *R. officinalis*

4.3.5.1 Avaliação da severidade de *P. griseola* para determinação da eficiência

A análise de variância do efeito das concentrações dos extratos secos de alecrim foram significativas sobre a severidade da mancha angular do feijoeiro (*P. griseola*), reduzindo a doença de forma local e sistêmica, atingindo níveis de controle de até 88% quando aplicado o extrato a 150 mg L⁻¹ (Tabela 4.5). Todas as concentrações foram estatisticamente iguais ao fungicida, tanto para a 3ª folha tratada e inoculada com o patógeno, como para a 4ª folha apenas inoculada com *P. griseola*.

A eficiência de alecrim na redução da severidade de doença também é relatada por Itako et al. (2009), os quais observaram menor número de lesões das folhas de tomateiro tratadas com extrato bruto de alecrim a 10% e 20% e inoculadas com *Cladosporium fulvum*, fungo causador da cladosporiose, quando comparadas com a testemunha. Da mesma forma, Röder et al. (2007) observaram que o tratamento com extrato aquoso de alecrim a 5% resultou em redução dos valores de incidência da podridão causada por *Colletotrichum* sp. em frutos de morango.

Tabela 4.5: Severidade e percentual de controle da mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extrato seco de *R. officinalis* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folha.

Tratamentos	Severidade (%)			
	3ª Folha	Controle (%)	4ª Folha	Controle (%)
0	3,3 b	-	0,5 b	-
50 mg L ⁻¹	0,5 a	84,8	0,2 a	60,0
100 mg L ⁻¹	0,5 a	84,8	0,1 a	80,0
150 mg L ⁻¹	0,4 a	88,0	0,1 a	80,0
200 mg L ⁻¹	0,9 a	72,7	0,1 a	80,0
Fungicida	0,2 a	93,9	0,03 a	94,0
Regressão:	0,000x ² - 0,047x + 3,086		y = 2E-05x ² - 0,006x + 0,512	
R ² :	0,896		0,911	

Médias seguidas de letra distinta diferem pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹).

4.3.5.2 Avaliação da severidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* para determinação da eficiência

A severidade do crestamento bacteriano comum foi reduzida significativamente na 3ª folha tratada com extrato seco de alecrim na concentração de 150 mg L⁻¹, chegando a 62% de controle e não diferindo do antibiótico. As demais

concentrações não diferiram da testemunha água. Para a 4ª folha, as concentrações de 100, 150 e 200 mg L⁻¹ resultaram em severidade inferior a testemunha água e não diferiram do tratamento químico, sendo que o maior nível de controle foi de 94,2% no tratamento 150 mg L⁻¹ do extrato de alecrim (Tabela 4.6).

Em trabalho desenvolvido por Vigo-Schultz (2008), o óleo essencial de alecrim não apresentou ação sobre o crestamento bacteriano comum, em feijão vagem cultivar Bragança, em condições de casa de vegetação, ou seja, não apresentou eficiência como o observado neste trabalho com o extrato seco, contudo, deve-se considerar a concentração dos princípios ativos presentes em cada forma de obtenção do extrato.

A eficiência dos extratos secos de alecrim pode ser atribuída a complexa composição química das plantas medicinais, que possuem princípios ativos e moléculas que podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos, tanto pela atividade antimicrobiana direta quanto pela indução de resistência (SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005), que ativa enzimas chaves como a β -1,3-glucanase, relatada por Kuhn (2007) que verificou aumento significativo da enzima quando as plantas de feijão que receberam tratamento com acibenzolar-S-metil (indutor de resistência comercial) e foram desafiadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Como a concentração com maior eficiência no controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, em condições de casa de vegetação, foi de 150 mg L⁻¹, e a mesma concentração foi suficiente também para a mancha angular (citado em 4.3.5.1), sugere-se esta para a extensão da pesquisa a campo, para ambos os patossistemas.

Por mais que para a mancha angular pudesse ser utilizada uma concentração menor, é necessário considerar que na prática, dificilmente tem-se a incidência de uma única doença, ao contrário, o que se observa a campo é a presença de mancha angular associado com o crestamento bacteriano comum, provavelmente pela temperatura que favorece a ocorrência das epidemias serem próximas, de 20 a 24°C para a mancha angular e de 28 a 30°C para o crestamento bacteriano (HERRERA, 2005). Dessa forma, a concentração de 150 mg L⁻¹ pode suprir o manejo para ambas as doenças.

Tabela 4.6: Severidade e percentual de controle do cretamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratados com extrato seco de *R. officinalis* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folha.

Tratamentos	Severidade (%)			
	3ª Folha	Controle (%)	4ª Folha	Controle (%)
0	14,5 b	-	6,8 c	-
50 mg L ⁻¹	14,2 b	2,1	5,4 bc	20,5
100 mg L ⁻¹	8,7 ab	40,0	3,0 ab	55,9
150 mg L ⁻¹	5,5 a	62,1	0,4 a	94,2
200 mg L ⁻¹	12,8 b	11,8	1,0 a	85,3
Antibiótico	2,7 a	81,4	1,7 a	75,0
Regressão:	$y = 0,000x^2 - 0,124x + 16,1$		$y = 0,000x^2 - 0,055x + 7,24$	
R ² :	0,599		0,943	

Médias seguidas de letra distinta diferem pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. Antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina)

4.3.6 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro

4.3.6.1 Avaliação de crescimento de parte aérea

As variáveis de crescimento observadas por meio da massa fresca e seca da parte aérea de plantas de feijoeiro tratadas com os extratos secos de alecrim e comparadas com plantas tratadas apenas com água, fungicida e antibiótico, demonstram que a concentração de 100 mg L⁻¹ estimulou o desenvolvimento, diferenciando da testemunha, dos controles químicos e da concentração de 50 mg L⁻¹. Ao avaliar a massa seca da parte aérea das plantas, observa-se aumento de 94% na concentração de 200 mg L⁻¹ quando comparado a testemunha água, ao passo que os demais tratamentos não diferenciaram entre si (Figura 4.3).

Os compostos químicos contidos no extrato vegetal afetam processos como a germinação das sementes, crescimento das plântulas, assimilação de nutrientes, fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, atividade enzimática e nutricional, permeabilidade da membrana, estruturas citológicas e ultra estruturais, fitoreguladores, tanto alterando suas concentrações quanto o balanço entre os diferentes hormônios, movimento dos estômatos, síntese de pigmentos, relações hídricas e alterações no material genético (DNA e RNA) (FERREIRA e ÁQUILA, 2000; SOARES e VIEIRA, 2000; PINA-RODRIGUES e LOPES, 2001), acarretando em efeito direto no desenvolvimento das plantas de feijoeiro observadas neste

trabalho. Isto é complexo o suficiente para descrever quais compostos do extrato poderiam estar agindo em cada atividade fisiológica na planta.

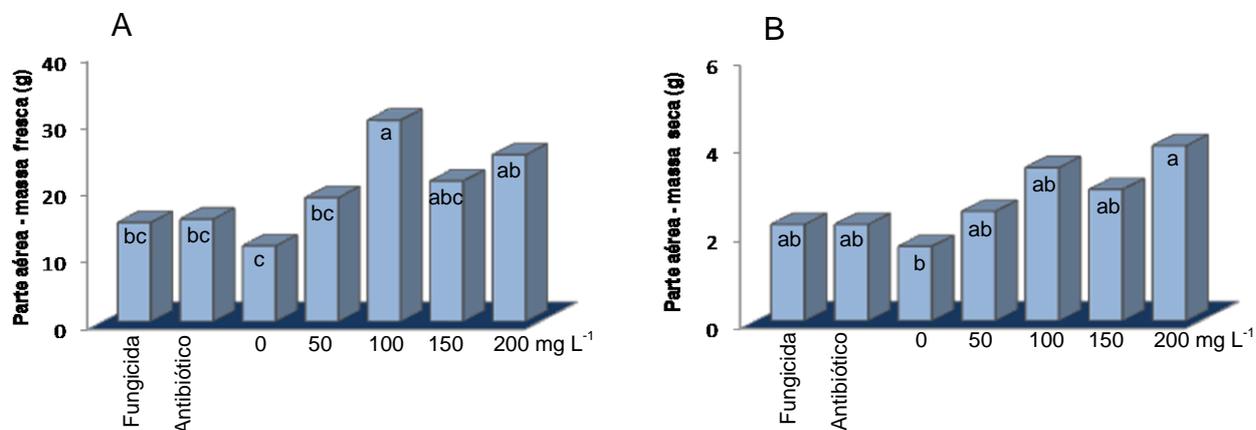


Figura 4.3: Massas fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *R. officinalis* comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

4.3.6.2 Avaliação de crescimento de raiz

A análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre o crescimento da raiz mostra-se significativa. Os extratos de alecrim não diferenciaram entre si, mas diferenciam da testemunha e dos controles químicos na concentração de 50 mg L⁻¹ para massa fresca e 200 mg L⁻¹ para massa seca, com estímulo de 61 e 59% respectivamente (Figura 4.4).

De forma incompatível com os resultados obtidos neste trabalho, em estudos realizados *in vitro* por Alves et al. (2004), utilizando extratos de uma espécie da família Lamiaceae, mesma família botânica do alecrim (*R. officinalis*), o alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* C.), sobre a germinação e crescimento de plantas bioindicadoras de alface (*Lactuca sativa* L.), observou-se efeito inibitório no comprimento da raiz, o qual foi proporcional a concentração do extrato, ou seja, quanto maior a concentração maior o efeito de inibição do crescimento. Da mesma forma, Viecelli & Cruz-Silva (2009) observaram inibição das raízes pelos extratos aquosos nas concentrações de 7,5; 15; 22,5 e 30% obtidos de folhas frescas de Sálvia (*Salvia officinalis* L.), em condições de laboratório.

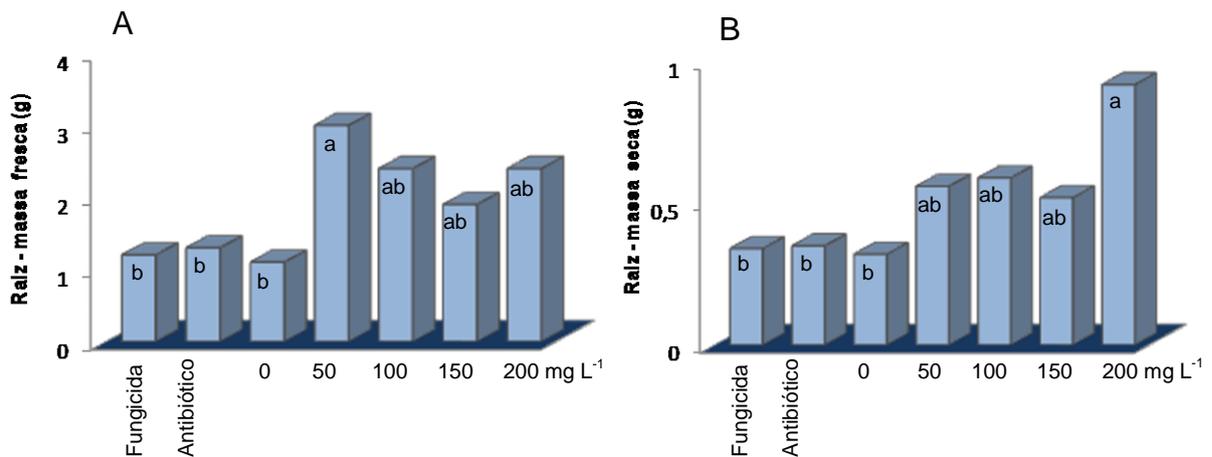


Figura 4.4: Massas fresca (A) e seca (B) da raiz de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *R. officinalis* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

A não semelhança entre os resultados dos extratos utilizando plantas da mesma família botânica pode ser compreendido pelo conceito de Reigosa et al. (1999), os quais relatam que os compostos químicos de uma planta podem agir em sinergismo provocando efeitos que podem ativar ou inibir o crescimento de outras plantas, dependendo da concentração testada.

4.3.7 Testes a campo para determinação da eficiência do extrato de *R. officinalis*

4.3.7.1 Avaliação da severidade a campo

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a mancha angular (*P. griseola*) em condições de campo foi reduzida significativamente quando as plantas de feijoeiro receberam duas e três aplicações dos extratos secos de alecrim na concentração de 150 mg L⁻¹, diferenciando da testemunha água e não diferenciando do fungicida (Tabela 4.7).

A eficiência do alecrim na redução da AACPD em fungos fitopatogênicos é confirmada por Menezes et al. (2009), os quais observaram valor de AACPD estatisticamente menor do que o valor encontrado para a testemunha, no controle da pinta preta (*Alternaria solani*) no tomateiro tratado com extrato aquoso de alecrim a 10%, em condições de casa de vegetação. Semelhantemente, os óleos de alecrim

(AACPD: 98,5) e carqueja (AACPD: 99,1) na concentração de 1% apresentaram maior efeito na indução de resistência em algodão, reduzindo em 68,9 e 55,1% a ramulose, respectivamente, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (SANTOS, BONALDO & SCHWAN-ESTRADA, 2011).

Conforme a Tabela 4.7, a AACPD do crestamento bacteriano comum (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) foi significativa com três aplicações do extrato de alecrim a 150 mg L⁻¹, com valor inferior a uma e duas aplicações do extrato e da testemunha água, e não diferenciando do antibiótico. Resultados contraditórios são relatados por Vigo et al. (2009), em ensaios com óleo essencial de alecrim a 0,5%, os quais não constataram diferenças da AACPD em relação à testemunha água e a testemunha água + leite em pó, sobre o crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) em feijão vagem, possivelmente devido a baixa concentração testada.

Tabela 4.7: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de alecrim (*R. officinalis*) na concentração de 150 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0), fungicida ou antibiótico, e desafiadas com *P. griseola* ou *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Tratamentos	AACPD	
	<i>P. griseola</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
Água	175 c	240 c
Fungicida	40,3 a	-
Antibiótico	-	35 a
1 aplicação	101,3 b	105,6 b
2 aplicações	71,3 ab	100,3 b
3 aplicações	52 a	50 a
Média Geral	87,9	106,1
C. V. (%)	20,1	14,8

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%. Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹). Antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina). DAS: dias após a semeadura.

No presente trabalho, destaca-se a eficiência do extrato seco de alecrim no controle da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, já a partir de uma única aplicação, quando comparados com a testemunha água. No entanto, os melhores resultados de controle foram obtidos com três aplicações.

4.3.7.2 Avaliação da produtividade a campo

4.3.7.2.1 Avaliação da produtividade do feijoeiro desafiado com *P. griseola*

A análise de variância do efeito dos tratamentos no número de vagens (Figura 4.5A) e número de grãos por plantas (Figura 4.5C), em condições de campo, não foi significativa. Porém, o número de grãos por vagem foi superior quando plantas de feijoeiro receberam três aplicações do extrato de alecrim a 150 mg L^{-1} , ao comparar com a testemunha água, não diferenciando do fungicida (Figura 4.5B). Para a massa de 100 grãos, os tratamentos com os extratos de alecrim não diferenciaram da testemunha água e apresentaram-se inferiores ao fungicida (Figura 4.5D).

Na avaliação da massa de grãos por planta, destaca-se o tratamento com uma aplicação do extrato seco de alecrim, por não diferenciar estatisticamente do fungicida e ser superior a testemunha água (Figura 4.5E). O mesmo comportamento é observado para a variável de produtividade (Kg ha^{-1}), no qual, uma aplicação do extrato de alecrim tem o mesmo potencial produtivo que o tratamento químico e apresentaram média de 61,4 e 62,2 sc ha^{-1} , respectivamente, com incremento de 34,6% ao comparar com a testemunha que apresentou produtividade de 45,6 sc ha^{-1} (Figura 4.5F).

O incremento da produtividade em plantas tratadas com extratos de plantas também é relatado por Röder (2006), o qual conduziu ensaios em condições de cultivo orgânico a campo com dois cultivares de morangueiro, 'Camarosa' e 'Dover', para controle de *Rhizopus* sp. e *Colletotrichum fragariae*, utilizando extratos aquosos a 10% de alecrim e arruda (*Ruta graveolens*). Verificou-se para 'Camarosa' que os tratamentos com alecrim reduziram em média 51,2% a quantidade de doença quando comparados com a testemunha (água). Esse valor foi similar àquele obtido com o tratamento com calda bordaleza (tratamento padrão utilizado pelo produtor em sistema orgânico de cultivo), no qual a redução na incidência de doença foi de 52%. Para os tratamentos com arruda a redução de doença foi de 39% em média. Isto se refletiu diretamente na produção de morangos, onde os tratamentos com alecrim permitiram incremento médio de 214% na produção em comparação com a testemunha e de 58% em relação ao tratamento com calda bordalesa. Para arruda, o incremento médio foi de 223% em relação à testemunha e de 67% em relação à calda bordalesa.

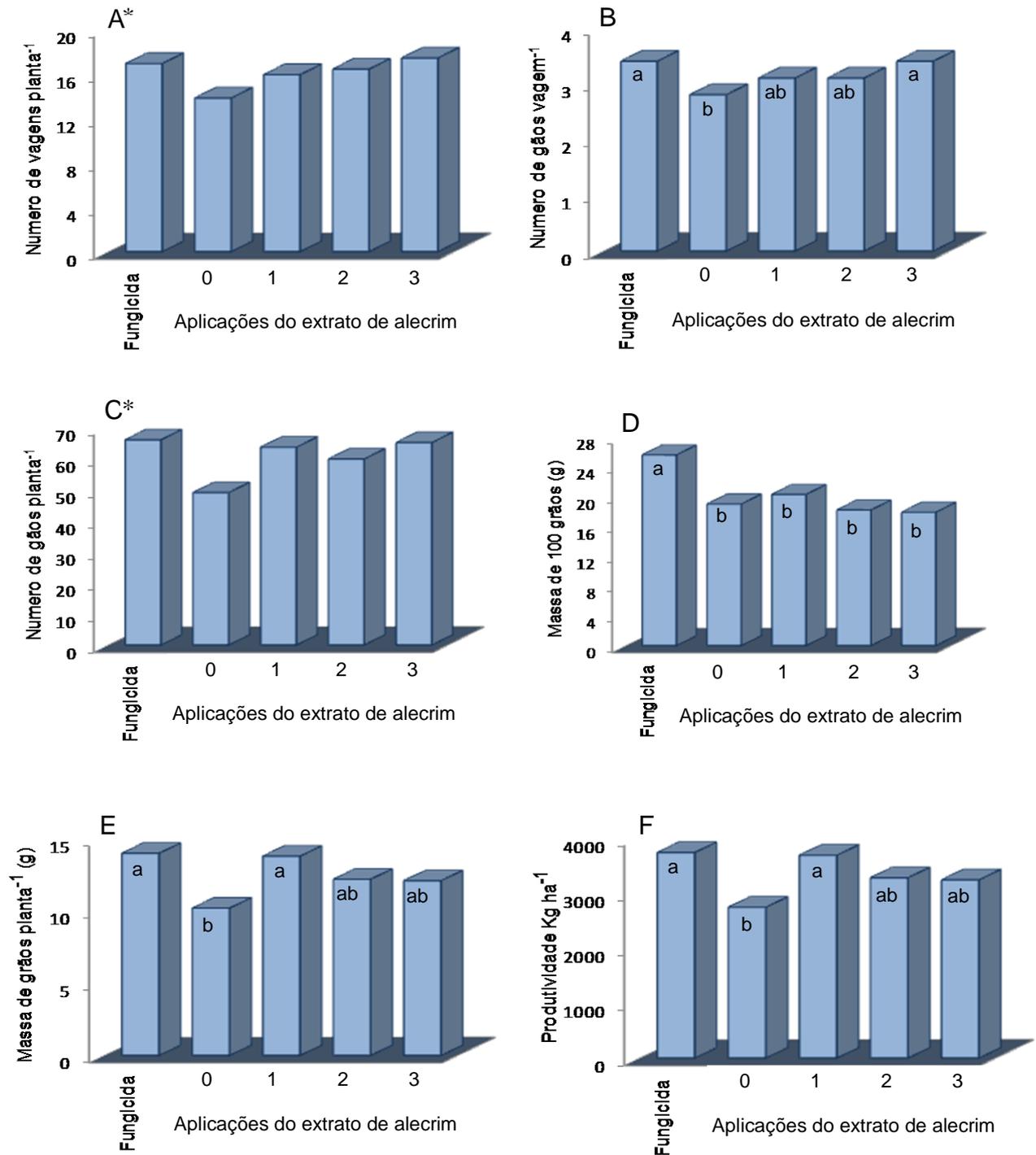


Figura 4.5: Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), número de grãos por planta (C), massa de 100 grãos (D), massa de grãos por planta (E) e produtividade (F) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de alecrim (*R. officinalis*) na concentração de 150 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0) ou fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹). As plantas foram inoculadas três vezes ao longo do ciclo da cultura com suspensão de esporos de *P. griseola* (4x10⁴ esporos mL⁻¹) aos três dias após a aplicação de cada tratamento. Asterisco (*) indica que não houve diferença significativa pela ANOVA ao passo que médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

No presente trabalho, observa-se que uma aplicação do extrato seco de alecrim mostra-se mais eficiente para a variável massa de grãos por planta, fator que interfere diretamente na produtividade, quando comparado com a testemunha, porém não diferente estatisticamente de duas e três aplicações. Esse resultado pode ser compreendido como a necessidade de distribuição de recursos internos da planta utilizados para a defesa, uma vez que o tratamento com três aplicações apresentou redução da doença (menor AACPD), possivelmente por ativar o metabolismo de defesa de forma mais eficiente, acarretando em competição por substrato comum e energia (HERMS & MATTSON, 1992; GAYLER et al., 2004) e resultando em menor produtividade.

Este custo da resistência induzida é definido por Heil & Baldwin (2002) como todo efeito negativo sobre a adaptabilidade das plantas que resulta da expressão de características de defesa quando a planta cresce sob condições semelhantes ao que se desenvolveu no processo evolutivo.

4.3.7.2.2 Avaliação da produtividade do feijoeiro desafiado com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

A média das variáveis de produtividade do feijoeiro inoculado com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e tratados com uma, duas e três aplicações do extrato de alecrim e comparados com a testemunha água e o antibiótico, não foram significativos para o número de vagens por planta (Figura 4.6A). Porém, o número de grãos por vagem das plantas tratadas com duas e três aplicações do extrato, não diferenciaram do antibiótico e dos demais tratamentos (Figura 4.6B). O número de grãos por planta apresentou tendência de aumento nas plantas que receberam três aplicações do extrato de alecrim, contudo foram estatisticamente iguais a testemunha e ao antibiótico (Figura 4.6C). Para a massa de 100 grãos, destacam-se os tratamentos com duas e três aplicações do extrato, os quais foram superiores a testemunha e ao tratamento com uma aplicação e estatisticamente iguais ao antibiótico (Figura 4.6D).

Para a massa de grãos por planta (Figura 4.6E) e para a produtividade (Figura 4.6F), o antibiótico e três aplicações do extrato de alecrim foram estatisticamente iguais e superiores aos demais tratamentos. Nestes, a produtividade atingiu o mais alto nível, com 39,9 e 41,1 sc ha⁻¹, respectivamente,

incrementos de 36,1 e 40,2% respectivamente, quando comparados a testemunha (29,3 sc ha⁻¹).

O aumento da produtividade com três aplicações do extrato seco de alecrim possivelmente está relacionado com a redução da AACPD de, em média, 50% em relação a uma e duas aplicações, justificando o aumento da massa de grãos por planta e, conseqüentemente, na produtividade. Nesta, a interação do extrato x planta x patógeno apresenta uma alocação de recursos para defesa de forma mais eficiente do padrão apresentado pelo feijoeiro desafiado com o fungo *P. griseola*.

A especificidade do efeito de extratos de plantas sobre a produtividade em diferentes culturas também é relatada por Santos et al. (2007), os quais verificaram que os extratos de alho, pimenta do reino + coentro e calda bordalesa a 1% proporcionaram incremento na produtividade da goiabeira de 27,19%, 27,45% e 35,02%, respectivamente, em relação à testemunha que foi pulverizada apenas com água. Isto ocorreu, provavelmente, em função dos macros e micronutrientes disponibilizados nos extratos de alho e pimenta do reino + coentro, bem como da presença de enxofre, cálcio e cobre na calda bordalesa que foram assimilados pela cultura, principalmente durante o estágio de crescimento dos frutos, época em que foram realizadas as aplicações. Os mesmos tratamentos não apresentaram diferença significativa para a cultura do maracujazeiro nas variáveis de número de frutos por planta e produtividade.

O aumento da resistência e dos aspectos produtivos das plantas de feijoeiro ao cretamento bacteriano comum quando tratadas com o extrato de alecrim está relacionada com a atividade antimicrobiana direta e possivelmente com a ativação de mecanismos de resistência, conforme descrito por Cavalcanti et al. (2006), os quais verificaram que acibenzolar-S-metil (ASM; 0,2 g L⁻¹), Ecolife (5 mL L⁻¹), suspensão de quitosana (200 g L⁻¹) proveniente de micélio de *Crinipellis pernicioso*, e extrato aquoso de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectados por *C. pernicioso* (VLA; 300 g L⁻¹) conferem capacidade parcial de proteção em plantas de tomateiro desafiadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, devido ao aumento da atividade de quitinase e β-1,3-glucanase, proteínas relacionadas à patogênese em folhas de plantas de tomateiro.

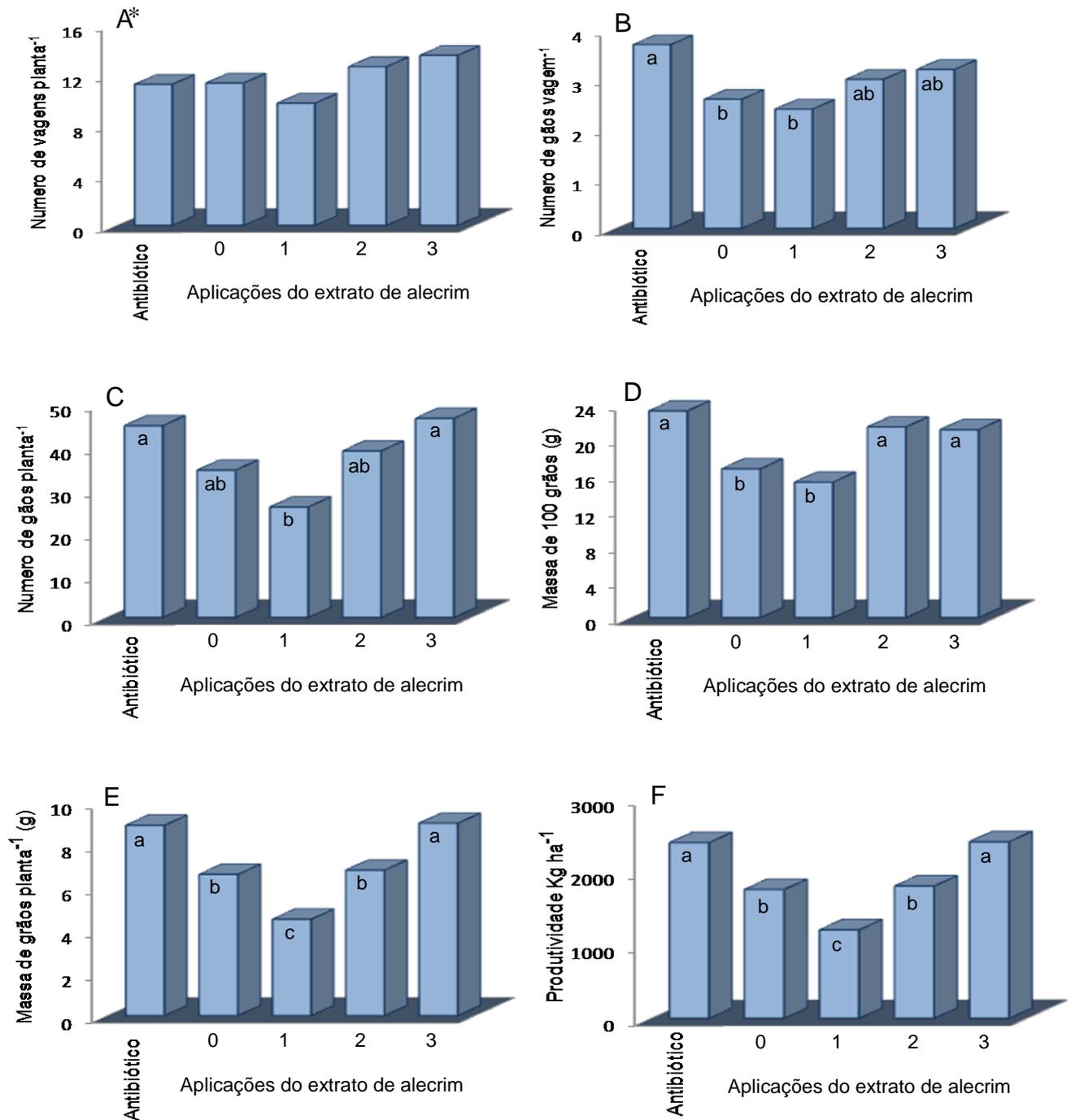


Figura 4.6: Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), número de grãos por planta (C), massa de 100 grãos (D), massa de grãos por planta (E) e produtividade (F) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com uma (14 DAS); duas (14 e 28 DAS) e três (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de alecrim (*R. officinalis*) na concentração de 150 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam três aplicações de água destilada (0) ou antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina). As plantas foram inoculadas três vezes ao longo do ciclo da cultura com suspensão bacteriana de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (5×10^7 UFC mL⁻¹) aos três dias após a aplicação de cada tratamento. Asterisco (*) indica que não houve diferença significativa pela ANOVA ao passo que médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Na cultura do feijoeiro, Campos et al. (2003) induziram resistência em quatro cultivares utilizando ácido salicílico (AS) e um isolado de *Colletotrichum lindemuthianum* avirulento e observaram que o fungo e o AS induziram a atividade de fenilalanina amônia-liase, com diferente padrão de resposta em cada variedade, demonstrando a especificidade dos mecanismos que regem a indução de resistência em plantas.

Portanto, para o controle da mancha angular do feijoeiro (*P. griseola*), o extrato seco de alecrim a 150 mg L^{-1} apresenta potencial quando aplicado uma vez no início do ciclo da cultura (aos 14 dias do plantio), garantindo produtividade semelhante a três aplicações com o fungicida e apresentando efeito benéfico ao meio ambiente, uma vez que o extrato é natural e não tóxico, além de reduzir custos de produção, evitando sucessivas aplicações.

Para o crestamento bacteriano comum (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*), o extrato de alecrim a 150 mg L^{-1} apresenta efeito semelhante ao antibiótico quando aplicado três vezes ao longo do ciclo da cultura, em intervalos de 14 dias, garantindo a produtividade e o respeito ao meio ambiente ao substituir o produto químico pelo extrato natural.

Corroborando com o conceito de Romeiro (2007), o qual ressalta a necessidade de investigar, com seriedade e persistência, métodos alternativos para o controle de doenças de plantas, que sejam, ao mesmo tempo, eficientes e menos agressivos à saúde humana e ao meio ambiente. Ativar os mecanismos de defesa da planta deixando que ela própria se proteja contra patógenos, em vez de saturá-la e intoxicá-la com defensivos, por certo será a estratégia politicamente correta do futuro.

Além de um produto natural e eficiente para a cultura do feijoeiro, esse extrato abre portas para o cultivo do alecrim visando o fornecimento de substrato para a elaboração do extrato seco, tornando-se mais uma opção de cultura para o produtor. O alecrim pode ser cultivado a partir de sementes ou estaquia (MARTINS et al., 2000) em fileira simples de 50 cm entre plantas e 1m entre linhas. É uma planta que tolera geadas severas e prefere regiões de grande luminosidade. A colheita pode ser realizada seis meses após o plantio, apresentando rendimento médio de 8.000 – 10.000 Kg de folhas verdes por ha (RIBEIRO & DINIZ, 2008).

4.4 CONCLUSÃO

Os testes realizados com o extrato seco de alecrim (*R. officinalis*) em estabilidade acelerada indicam que a validade do mesmo é de 24 meses. As concentrações testadas *in vitro* apresentam atividade antimicrobiana sobre a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e sem efeito sobre o fungo *P. griseola*, patógenos causadores do crestamento bacteriano comum e da mancha angular do feijoeiro, respectivamente. A massa fresca e seca da parte aérea e da raiz de plantas de feijoeiro foram incrementadas quando tratadas com os extratos secos de alecrim.

A avaliação de severidade em casa de vegetação indica que todas as concentrações são eficientes no controle da mancha angular do feijoeiro, ao passo que para o crestamento bacteriano comum destaca-se a concentração de 150 mg L⁻¹, sendo a concentração escolhida para os testes a campo por apresentar eficiência na redução da severidade em ambas as doenças.

A campo, a concentração de 150 mg L⁻¹ do extrato seco de alecrim apresentou redução da AACPD e aumentou a produtividade (Kg ha⁻¹) quando aplicadas uma vez em plantas desafiadas com *P. griseola* e três vezes quando inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Nestes tratamentos, a produtividade foi semelhante às três aplicações do produto químico padrão para controle.

Os resultados comprovam a eficiência do extrato formulado a base de alecrim para o controle da mancha angular do feijoeiro e do crestamento bacteriano comum, disponibilizando ao produtor uma alternativa de controle de doenças ecologicamente correta, além de valorizar a emergência de uma cultura de subsistência que é a produção de alecrim como fonte de substrato para a elaboração do extrato.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. C. S.; FILHO, S. M.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.

ARSLAN, U.; ILHAN, K.; KARABULUT, O.A. Antifungal activity of aqueous extracts of spices against bean rust (*Uromyces appendiculatus*). **Allelopathy Journal**. v. 24, n. 1 p.207-213, 2009.

ASSIS, R.L. Agroecologia: visão histórica e perspectiva no Brasil. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. **Agroecologia princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. Brasília, DF.:Embrapa, p.174-176, 2005.

BRAND, S.C.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; MILANESI, P.M.; SCHEREN, M.B.; ANTONELLO, L.M. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p.1881-1887, 2010.

CAMATTI-SARTORI, V.; MAGRINI, F.E.; CRIPPA, L.B.; MARCHETT, C.; VENTURIN, L.; SILVA- RIBEIRO, R.T. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**. n.6, v.2, p.117-122, 2011.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 532p. 1990.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; SILVA, J.B.; OSÓRIO, V.A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, n.3, p.129-134, 2003.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA R.B.; COSTA, J.C.B.; CARVALHO, C.P.S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1721-1730, 2006.

CORRÊA Jr., C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. Jaboticabal: FUNEP. 162p. 1994.

COSTA, C.M.G.R.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M.; AGRA, P.F.M.; FARIAS, M.A.A. Inibição do crescimento bacteriano *in vitro* de *Erwinia carotovora* pelo óleo essencial de alecrim. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.2, n.2, p.7-10, 2008.

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

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de feijão**. Piracicaba: Livroceres. 386p. 2007.

FERREIRA, D.F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 66p. 2000.

FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Edição especial, 2000.

FERREIRA, C.M.; SANTOS, M.L.; BRAGA, M.J.; DEL PELOSO, M.J. Aspectos econômicos. In.: VIEIRA, C. PAULA JUNIOR, T.B.; BORÉM, A. **Feijão**. 2ª ed. Viçosa: UFV. p.19-40, 2006.

GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the "trade off" between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**. v.18, p.363-371. 2004.

GODOY, C.V.; CARNEIRO, S.M.T.P.G; IMAUTI, M.T.; DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGER, R.D.; BERGAMIN FILHO, A. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.104, n.4, p.336-345, 1997.

HEIL, M.; BALDWIN, I.T. Fitness cost of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**. v.7, p.61-67, 2002.

HERMS, D.A.; MATTSON, W.J. The dilemma of plants: to grow or defend. **The Quarterly Review of Biology**. v.67, p.283-335, 1992.

HERRERA, P.A.R. Determinación de la incidencia de distintas enfermedades em frejol (*Phaseolus vulgaris* L.), soya (*Glycine max* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) cultivados bajo dos sistemas de Riego: aspersión mediante pivote central y riego por surcos. Trabalho de conclusão de curso da Universidad de Talca, Talca:Chile, 54p. 2005.

ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.3, p.241-244, 2008.

KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção. Tese de doutorado: ESALQ, 140p, 2007.

LUQMAN, S.; DWIVEDI, G.R.; DAROKAR, M.R.; KAIRA, A.; KHANUJA, S.P.S. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Alternative Therapies**. v.13, n.5, p.54-59, 2007.

MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p.49-52, 2000.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. Isolamento de bactérias fitopatogênicas. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 184p. 2000.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 220p. 2000.

MARTINS, E.S.C.S.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M; FARIAS, M.A.A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* da bactéria *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.3, p.29-34, 2009.

MARTINS, E.S.C.S.; FARIAS, M.A.A.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M. Efeito dos óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* em pimentão. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa v.4, n.1, p.09-13, mar. 2010.

MENEZES, V.O.; PEDROSO, D.C.; DILL, A.M.; SANTOS, R.F.; MULLER, J.; JUNGES, E.; MUNIZ, M.; BLUME, E. Uso de extratos vegetais *in vivo* no controle de *Alternaria solani* e na produtividade do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.4, n.2, p.1108-1112, 2009.

MORAES, W.B.C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.175-190. 1992.

PASCHOLATI, S.F. 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**. 4ª edição, v.1, Piracicaba: Agronômica Ceres, p.593-633, 2011.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14ª edição. Piracicaba: Nobel, 477p. 2000.

PINA-RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, B.M. Potencial Alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Revista Floresta e Ambiente**. v.8, n.1, p.130-136, 2001.

PITAROKILI, D.; TZAKOU, O.; LOUKIS, A. Composition of the essential oil of spontaneous *Rosmarinus officinalis* from Greece and antifungal activity against phytopathogenic fungi. **Journal of Essential Oil Research**. v.20, n.5, p.457-459, 2008.

RAVA, C.A, SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO A.; RAVA, C.A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Embrapa: Brasília, p.217-242. 1994.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. Ecophysiological Approach in Allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 1999.

RIBEIRO, P.G.F.; DINIZ, R.C. **Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 218p. 2008.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas: Fundamentos**. Viçosa: UFV, 269p. 2007.

RÖDER, C.; STANGARLIN, J.R.; PAZUCH, D.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle alternativo de podridões no morango com tratamentos em pré-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 (Suplemento), p.201, 2007.

SAGLAM, C.; OZCAN, M.M.; BOYRAZ, N. Fungal Inhibition by Some Spice Essential Oils. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v.12, n.6, p.742-750, 2009.

SANTOS, B.T.; BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R. Óleos essenciais de espécies florestais e medicinais no controle de ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) em algodão. **Anais..Cadernos de Agroecologia**, Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza/CE, v.6, n.2, p.1-4, 2011.

SANTOS, J.F.; LEMOS, J.N.R.; ALBUQUERQUE, I.C.; BRITO, L.M.P. Produção de goiabeira e maracujazeiro utilizando alternativa orgânica. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.1, n.1, p.15-18, 2007.

SARTORATO, A.; AQUINO, A.R.L.; CONTO, A.J.; SILVEIRA FILHO, A.; SEIJAS, C.A.R.; OLIVEIRA, I.P.; KLUTHCOUSKI, J.; ROCHA, J.A.M.; YOKOYAMA, M.; SILVEIRA, P.M.; GUAZZELLI, R.J. **Recomendações técnicas para a cultura de feijão com irrigação suplementar**. 2ª edição. Goiânia: Embrapa-CNPAP, 21p. Circular técnica 16, 1983.

SCAPIN, C.R.; CARNELOSSI, P.R.; VIEIRA, R.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxidade *in vitro* de extratos vegetais sobre *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.1, p. 57-61, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S.; Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.28 (suplemento), p.554-556, 2003.

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.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.125-138, 2005.

SOARES, J.C.F.; VIEIRA, T.R. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (“grand rapids”) por extratos aquosos de cinco espécies de *Gleicheniaceae*. **Revista Floresta e Ambiente**, v.7, n.1, 2000.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.11, p.16-21, 1999.

STANGARLIN, J.R, PASCHOLATI, S.F, LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.1, p.59-66. 2000.

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.

TAGAMI, O.K.; GASPARIN, M.D.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; TOLENTINO JUNIOR, J.B.; MORAES, L.M.; STANGARLIN, J.R. ungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.2, p.285-294, 2009.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Compêndio de Fitoterapia**. Curitiba: Herbarium, Laboratório Botânico, 317p. 1997.

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

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT – A software for plant disease severity assessment. **8th International Congress of Plant Pathology**, 105p. 2003.

VELLOSO, C.C.; PEGLOW, K. **Plantas medicinais**. 4^a ed. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2003.

VIECELLI, C.A; CRUZ-SILVA, C.T.A. Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.1, p.39-46, 2009.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.2, p.81-90, 2009.

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 *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.73-80, 2010.

VIGO-SCHULTZ, S.C. Avaliação da indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijão vagem. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 78p. 2008.

VIGO, S.C.; MARINGONI, A.C.; CAMARA, R.C.; LIMA, G.P.P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crescimento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa phytopathologica**, v.35, n.4, p.293-304, 2009.

5 CAPÍTULO II - FORMULAÇÃO DE EXTRATO DE CÚRCUMA (*Curcuma longa*) PARA O CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM FEIJOEIRO

RESUMO

O controle alternativo mostra-se como solução para resgatar a qualidade do meio ambiente e a saúde dos produtores e consumidores, pois utiliza extratos de vegetais como o de cúrcuma (*Curcuma longa*) para controlar doenças em plantas. Nesse contexto, objetivou-se nesse trabalho desenvolver um extrato seco a base de cúrcuma, e determinar a validade, efeitos sobre o desenvolvimento de plantas de feijão e testes antimicrobianos *in vitro* e controle em casa de vegetação e campo da mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) e do crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). Foram utilizados extratos nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, além da testemunha água, fungicida (azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹) para os ensaios com mancha angular e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para o crestamento bacteriano comum. Os resultados demonstram que para a mancha angular do feijoeiro, a validade do extrato seco de cúrcuma é de 24 meses, e quando se visa controlar o crestamento bacteriano comum a validade é de 18 meses. A concentração de 50 mg L⁻¹ inibiu a germinação dos esporos de *P. griseola* e 100, 150 e 200 mg L⁻¹ inibiram a multiplicação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Todas as concentrações reduziram a severidade das doenças em casa de vegetação e tenderam a estimular a massa fresca e seca da parte aérea e da raiz do feijoeiro. A campo, a concentração de 50 mg L⁻¹ aplicada uma, duas e três vezes ao longo do ciclo da cultura em intervalos de 14 dias, reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença, porém a produtividade foi superior a testemunha e semelhante ao controle químico quando aplicado três vezes, para ambas as doenças. Dessa forma, mostra-se viável o uso do extrato seco de cúrcuma para o controle dessas doenças em feijoeiro.

Palavras-chave adicionais: planta medicinal, Zingiberaceae, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudocercospora griseola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

5 CAPÍTULO II - FORMULATION OF TURMERIC EXTRACT (*Curcuma longa*) FOR ALTERNATIVE CONTROL OF BEAN DISEASES

ABSTRACT

The alternative control is a way to recover the quality of the environment and health of producers and consumers because it uses plant extracts such as turmeric (*Curcuma longa*) to control plant diseases. In this context, this study aimed to develop a product based on the dry extract of turmeric, and determine the validity, effect on the development of bean plants, *in vitro* antimicrobial test and control in greenhouse and in field of angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola*) and common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). It were used the concentrations of 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹, and the control with water, fungicide (azoxystrobin 40 mg L⁻¹) for angular leaf spot assay and antibiotic (22.5 mg L⁻¹ + oxytetracycline 225 mg L⁻¹ streptomycin) for common bacterial blight. The results showed that for the angular leaf spot, the validity of the dry extract of turmeric is 24 months, and to control bacterial blight the validity is 18 months. The concentration of 50 mg L⁻¹ inhibited germination of *P. griseola* and 100, 150 and 200 mg L⁻¹ inhibited the multiplication of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. All concentrations reduced the severity of the diseases in greenhouse and tended to stimulate fresh and dry mass of shoots and roots of beans. In the field, the concentration of 50 mg L⁻¹ sprayed one, two and three times over the course of the culture every 14 days reduced area under the disease progress curve, but the yield was greater than control treatment with water and similar to chemical control when applied three times, for both diseases. Thus, it is shown the potential of dry extract of turmeric for the control of these disease in bean.

Keywords: medicinal plant, Zingiberaceae, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudocercospora griseola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

5.1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes constituintes na dieta dos brasileiros, especialmente por ser fonte de carboidratos, proteínas e ferro, tornando o Brasil o maior produtor mundial dessa cultura (BOREM & CARNEIRO, 2006), sendo o Estado do Paraná o maior produtor nacional (IBGE, 2011). Porém, doenças de parte aérea como a mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* e o crestamento bacteriano comum incitada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, contituem as principais causas da sua baixa produtividade (PAULA JUNIOR & ZAMBOLIM, 2006).

Para conter o avanço desses patógenos com alto poder de destruição, a proteção química com fungicidas é a técnica mais utilizada (AZEVEDO, 2003), contudo, a seleção de isolados resistentes dos patógenos aos produtos químicos e a contaminação do meio ambiente (GHINI & KIMATI, 2000; ASSIS, 2005) ressaltam a necessidade de um manejo sanitário consciente, como o controle alternativo de doenças em plantas, que envolve a indução de resistência (PASCHOLATI, 2011) e o uso de extratos vegetais com atividade antimicrobiana direta e/ou indutora de resistência (STANGARLIN, KUHN & SCHWAN-ESTRADA, 2008). Entre as plantas cujo extrato apresenta este potencial, destaca-se a cúrcuma ou açafrão.

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) é uma planta da família Zingiberaceae, originária do sudeste asiático (CECÍLIO FILHO, 1996). Utilizada desde a antiguidade na medicina e gastronomia do oriente, a cúrcuma vem se tornando importante, atualmente, no combate a vários problemas de saúde humana, podendo-se destacar alguns efeitos de seus componentes como: antiinflamatório (ARAÚJO & LEON, 2001), antioxidante (BALASUBRAMANYAN et al., 2003) e atividades contra protozoários (ARAÚJO et al., 1999), bactérias (UECHI et al., 2000), fungos (APISARIYAKUL, VANITTANAKOM & BUDDHASUKH, 1995), e nematóides (ARAÚJO & LEON, 2001). Outros trabalhos também relatam que a cúrcuma promove benefícios como a inibição do vírus da imunodeficiência humana Tipo-1 (MAZUMDER et al., 1995), além de possuir atividade antitumorígena (SURH, 2002), anticarcinogênica (LIN & LIN-SHIAU, 2001) e atividade antimutagênica (ARAÚJO & LEON, 2001).

Balasubramanyam et al. (2003) determinaram que a curcumina apresenta ação inibitória sobre a atividade da proteína-Kinase C, determinando um importante

potencial terapêutico no tratamento da diabetes. Miquel et al. (2002) relataram que extratos hidroalcoólicos de rizoma de cúrcuma e curcumina diminuíram o risco cardiovascular em humanos. Ribeiro & Diniz (2008) recomendam como cicratizante, hepatoprotetor, colerético (estimula a produção da bile), colagogo (eliminação da bile pela vesícula biliar), antiséptico, digestivo, vermífugo e redutor do colesterol e da glicose.

O rizoma de cúrcuma é rico em compostos como turmerona, α e β -pineno, canfeno, limoneno, terpineno, cariofileno, linalol, borneol e cineol (RIBEIRO & DINIZ, 2008), e compostos fenólicos como os curcuminóides. Os curcuminóides estão quimicamente relacionados ao seu principal ingrediente, a curcumina. Três principais curcuminóides foram isolados da cúrcuma: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina (BALASUBRAMANYAM et al., 2003).

A utilidade medicinal e condimentar da cúrcuma despertaram o interesse dos pesquisadores em utilizá-lo no controle de doenças em plantas. Alguns trabalhos recentes relatam a eficiência de extratos de cúrcuma no controle da mancha parda, crestamento foliar e oídio na soja, causados pelos fungos *Septoria glycines*, *Cercospora kikuchii* e *Microsphaera diffusa*, respectivamente (BECKER et al., 2004). Na cultura do tomate citam-se resultados positivos para pinta preta (*Alternaria solani*) (BALBI-PEÑA et al., 2006b) e murcha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) (STANGARLIN & KUHN, 2009). Na cultura da mandioca, relata-se para murcha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (KUHN et al., 2006) e em arroz para mancha folicular bacteriana (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) (JABEEN et al., 2011).

Devido ao histórico da cúrcuma na medicina popular e aos resultados promissores no controle de doenças em plantas, objetivou-se nesse trabalho a formulação de um extrato estável a base dessa planta, determinando sua validade e avaliação da eficiência no controle da mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) e do crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) do feijoeiro, em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção e manutenção de *P. griseola*

O isolado de *P. griseola* foi obtido a partir de lesões em folhas de feijoeiro naturalmente infectadas, coletadas na lavoura da Fazenda Escola da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, Paraná, e cultivado em meio de suco de tomate (200 mL de suco de tomate integral + 15 g de ágar + 4,5 g de CaCO₃ + 800 mL de água destilada), por 14 dias a temperatura de 24 °C com escotofase total (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000).

5.2.2 Obtenção e manutenção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

A bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi obtida de folhas de feijoeiro infectadas naturalmente com a doença, provenientes na lavoura da Fazenda Escola da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, Paraná. O isolamento foi realizado com fragmentos da folha (0,5 cm) na área de transição tecido sadio e tecido doente, o qual foi imerso em álcool 50% por 30 segundos, em seguida em hipoclorito de sódio (1%) por 1 min e, posteriormente, em água destilada. Após esta desinfestação superficial, foi realizada a maceração em solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada e então, com alça de platina, transferida uma alíquota do macerado para placas de Petri contendo meio ágar-nutriente, realizando-se estrias compostas. Em seguida, as placas foram identificadas, invertidas e incubadas a 25 °C, observando-se seu crescimento após 48 h (MARIANO & SILVEIRA, 2000).

A curva de crescimento bacteriano foi obtida pelo método de determinação da concentração do inóculo pela contagem em placas, descrito por Mariano & Assis (2000). Foi preparada uma suspensão da bactéria teste a partir da cultura em placas com 48 h de incubação. Foram ajustadas concentrações bacterianas para obter leituras de absorbância a 560 nm de 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,0. Cada uma das suspensões foi diluída até 10⁷, 10⁸ e 10⁹.

Foi pipetado 1 mL de cada diluição e espalhado uniformemente com alça de vidro flambada e esfriada em placas de Petri com meio ágar-nutriente, preparando-se quatro placas para cada diluição, as quais foram invertidas e incubadas a 25 °C por 48 h. Foi obtida pelo menos uma série de placas contáveis (que apresentasse entre 30 a 300 colônias) para cada absorbância. Os dados de unidades formadoras

de colônia (UFCs) foram transformados para uma mesma base de 10^{10} , obtendo-se, posteriormente, uma equação de regressão.

Para a definição da concentração da suspensão bacteriana foi efetuado o cálculo: $\text{UFC mL}^{-1} = \text{número médio de colônias} \times \text{diluição da amostra}$. Os dados de concentração (UFC) foram transformados para uma mesma base de 10^{10} , obtendo-se, posteriormente uma equação de regressão

5.2.3 Formulação e determinação da validade do extrato de *C. longa*

Os rizomas de cúrcuma foram coletados em propriedades rurais no município de Marechal Cândido Rondon, lavados, secados em papel toalha e congelados a -4°C . Após um mês descongelou-se lentamente em geladeira para realização da trituração com água destilada em liquidificador durante 2 minutos, na proporção de 600 g de rizoma de curcuma para 700 mL de água destilada, ou seja, a 85,7%, sendo esta a máxima concentração que permitiu uma uniforme trituração. Em seguida, filtrou-se o extrato em uma peneira de controle granulométrico de 48 mesh e o bagaço retido nessa peneira foi prensado em pano e juntado ao extrato filtrado para melhor aproveitamento do mesmo. O extrato aquoso obtido na filtração com a peneira de 48 mesh foi novamente filtrado em uma peneira de 200 mesh, sendo o bagacilho retido na peneira descartado e o extrato filtrado final foi coletado, determinado o teor de sólidos solúveis e em seguida procedida a secagem.

O teor de sólidos solúveis foi determinado pela adição de 5 gotas do extrato aquoso filtrado de curcuma no refratômetro do tipo ABBE. Após a verificação, procedeu-se a secagem do extrato em um atomizador (Spray Dryer) de bancada que utiliza ar comprimido e energia elétrica como fonte geradora de calor. A temperatura de entrada no atomizador era de 175°C e na saída 105°C . O tempo de secagem foi de duas horas e vinte minutos, com rendimento de 8,1 gramas a partir de 1.100 mL de extrato aquoso filtrado de rizomas de curcuma, com 0,7% de teor de sólidos solúveis.

O extrato seco foi coletado e rapidamente acondicionado em envelopes impermeáveis e lacrados em seladora manual. Posteriormente, parte dessas amostras foram mantidas em temperatura ambiente e protegidas do sol para a determinação da eficiência *in vitro* e *in vivo* dos extratos sobre *P. griseola* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Outra parte das amostras foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada, mantendo-as em estufa a 40°C por até seis meses e a cada

dois meses uma amostra foi retirada da estufa e mantidas a temperatura ambiente até completar seis meses e posteriormente esse extrato seco foi diluído em água destilada nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, para realização dos testes *in vitro* e *in vivo* com os patógenos para determinação do tempo de prateleira, conforme norma da ANVISA, por meio da resolução - RE nº 398, de 12 de novembro de 2004, publicada no Diário Oficial da União de 16 de novembro de 2004, a qual determina que, se o produto não apresentar alteração no efeito após os 6 meses na estufa, atribui-se 24 meses de validade.

5.2.4 Testes *in vitro* para determinação da validade do extrato de *C. longa*

5.2.4.1 Inibição da germinação de esporos

Para *P. griseola* o teste foi realizado em lâmina de microscopia revestida por fina camada de ágar-água a 1% (1000 µL por lâmina). Alíquotas de 40 µL do extrato seco de cúrcuma sob estabilidade acelerada com 0, 2, 4 e 6 meses na estufa a 40°C, ajustadas para se obter as concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e alíquotas de 40 µL da suspensão de conídios de *P. griseola* (1x10⁴ conídios mL⁻¹), obtidos de cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida com escotofase total a 24 °C. A porcentagem de germinação foi determinada 24 h após o início do experimento com a adição de 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação dos conídios (STANGARLIN et al., 1999).

5.2.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana

Para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparado meio de cultura caldo nutriente (extrato de carne: 3 g; peptona: 5 g; glicose: 15 g; água destilada: 1.000 mL) (MARIANO & SILVEIRA, 2000). O meio de cultura (10 mL tubo⁻¹) recebeu as diferentes concentrações do extrato seco de cúrcuma sob estabilidade acelerada em 0, 2, 4 e 6 meses na estufa a 40°C, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, e, posteriormente, foram esterilizados em autoclave. Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células bacterianas contendo 10¹⁰ UFC mL⁻¹ foi adicionada a cada tubo, os quais foram incubados a 28 °C por 48 h em estufa incubadora sob agitação a 150 rpm. A avaliação do número de bactérias foi realizada por espectrofotometria,

anotando-se a absorvância a 560 nm de cada amostra e calculando-se o valor de UFCs de acordo com a curva de crescimento bacteriana previamente elaborada.

5.2.5 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de *C. longa*

5.2.5.1 Cultivo em casa de vegetação para determinação da validade

Os ensaios foram conduzidos em cultivo protegido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712 m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S.

Cinco plantas de feijoeiro (cultivar IAPAR 81 – Carioca) foram cultivadas em vasos plásticos, contendo 20 L de substrato com solo, areia e matéria orgânica (proporção 2:1:1). Cada tratamento foi composto por cinco vasos, os quais representavam as repetições. Não se realizou adubação devido a análise de solo apresentar resultados satisfatórios de nutrientes.

5.2.5.2 Aplicação dos extratos com estabilidade acelerada

Aplicou-se os tratamentos com os extratos secos de cúrcuma submetidos a 0, 2, 4 e 6 meses na estufa a 40 °C para atribuir a estabilidade acelerada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, adicionando-se 0,25% de adjuvante natural (obtido da trituração de 100 g de linhaça hidratada com 1L de vinagre de vinho natural, e mantido a temperatura ambiente e no escuro por 20 dias), metodologia informada por Márcia Vargas Toledo – EMATER - Comunicação pessoal. Os tratamentos foram aplicados por aspersão na 3ª folha (fase vegetativa V4) em quantidade de 1 mL por folha.

5.2.5.3 Inoculação de *P. griseola* em casa de vegetação

A suspensão de conídios de *P. griseola* foi preparada em água com Tween 20 (uma gota 500 mL⁻¹) a partir de uma colônia com 14 dias de idade, sendo a concentração ajustada para 4x10⁴ conídios mL⁻¹. A inoculação em casa de vegetação foi realizada três dias após a aplicação dos extratos secos de cúrcuma com estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada (fase vegetativa V4). A inoculação foi realizada no início da

noite para que as plantas permanecessem no escuro para garantir a infecção e mantidas à temperatura ambiente (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000).

5.2.5.4 Inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em casa de vegetação

A suspensão bacteriana com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparada com solução salina (0,85% de NaCl) a partir de um isolado com 48 horas de cultivo e ajustada na concentração de 5×10^7 UFC mL⁻¹ (RAVA & SARTORATO, 1994). Foram inoculadas três dias após a aplicação dos tratamentos com extratos secos de cúrcuma com estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada. A inoculação foi realizada no início da noite e as plantas mantidas à temperatura ambiente.

5.2.5.5 Avaliação da severidade para determinação da validade

A severidade da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro em casa de vegetação foi avaliada na 3ª e 4ª folhas aos 21 dias após a inoculação, por determinação da área lesionada com o auxílio do sistema computacional QUANT v. 1.0.2 (VALE, FERNANDES FILHO & LIBERATO, 2003).

5.2.6 Testes *in vitro* para determinação da eficiência do extrato de *C. longa*

5.2.6.1 Inibição da germinação de esporos

Para *P. griseola* o teste foi realizado em lâmina de microscopia revestida por fina camada de ágar-água a 1% (1000 µL por lâmina). Alíquotas de 40 µL do extrato seco de cúrcuma que não foi submetido a estabilidade acelerada (mantidos em temperatura ambiente), ajustadas para se obter as concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e alíquotas de 40 µL da suspensão de conídios de *P. griseola* (1×10^4 conídios mL⁻¹) obtidos de cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida com escotofase total a 24 °C. A porcentagem de germinação foi determinada 24 h após o início do experimento com a adição de 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação dos conídios (STANGARLIN et al., 2010). Como controles utilizaram-se água, fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e água com 0,25% de adjuvante natural.

5.2.6.2 Inibição da multiplicação bacteriana

Para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparado meio de cultura caldo nutriente (MARIANO & SILVEIRA, 2000). O meio de cultura (10 mL tubo⁻¹) recebeu as diferentes concentrações do extrato seco de cúrcuma que não foi submetido a estabilidade acelerada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e, posteriormente, foram esterilizados em autoclave. Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células bacterianas contendo 10¹⁰ UFC mL⁻¹ foi adicionada a cada tubo, os quais foram incubados a 28 °C por 48 h em estufa incubadora sob agitação a 150 rpm. A avaliação do número de bactérias foi realizada por espectrofotometria, anotando-se a absorbância a 560 nm de cada amostra e calculando-se o valor de UFCs de acordo com a curva de crescimento bacteriano previamente elaborada. Como tratamentos controles utilizaram-se apenas o meio de cultura, antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e o meio de cultura com 0,25% de adjuvante natural.

5.2.7 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de *C. longa*

5.2.7.1 Cultivo em casa de vegetação

Os ensaios foram conduzidos em cultivo protegido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712 m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S.

Cinco plantas de feijoeiro (cultivar IAPAR 81 – Carioca) foram cultivadas em vasos plásticos, contendo 20 L de substrato com solo, areia e matéria orgânica (proporção 2:1:1). Cada tratamento foi composto por cinco vasos, os quais representavam as repetições. Não se realizou adubação devido a análise de solo apresentar resultados satisfatórios de nutrientes.

5.2.7.2 Aplicação dos tratamentos em casa de vegetação

Aplicou-se os tratamentos com os extratos secos de cúrcuma, não submetidos a estabilidade acelerada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, e os controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crescimento bacteriano comum. Nos extratos e

no controle água foram adicionados 0,25% de adjuvante natural. Os tratamentos foram aplicados por aspersão na 3ª folha trifoliolada (fase vegetativa V4), em quantidade de 1 mL por folha.

5.2.7.3 Inoculação de *P. griseola* em casa de vegetação

A suspensão de conídios de *P. griseola* foi preparada em água com Tween 20 (uma gota 500 mL⁻¹) a partir de uma colônia com 14 dias de idade, sendo a concentração ajustada para 4x10⁴ conídios mL⁻¹. A inoculação em casa de vegetação foi realizada três dias após a aplicação dos extratos secos de cúrcuma não submetidos a estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada (fase vegetativa V4). A inoculação foi realizada no início da noite para que as plantas permanecessem no escuro para garantir a infecção e mantidas à temperatura ambiente (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000).

5.2.7.4 Inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em casa de vegetação

A suspensão bacteriana com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparada com solução salina (0,85% de NaCl) a partir de um isolado com 48 horas de cultivo e ajustada na concentração de 5 x 10⁷ UFC mL⁻¹ (RAVA & SARTORATO, 1994). Foram inoculadas três dias após a aplicação dos tratamentos com extratos secos de cúrcuma não submetidos a estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada. A inoculação foi realizada no início da noite e as plantas mantidas à temperatura ambiente.

5.2.7.5 Avaliação da severidade para determinação da eficiência

A severidade da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro em casa de vegetação foi avaliada na 3ª e 4ª folhas aos 21 dias após a inoculação, por determinação da área lesionada com o auxílio do sistema computacional QUANT v. 1.0.2 (VALE, FERNANDES FILHO & LIBERATO, 2003).

5.2.8 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro em casa de vegetação

5.2.8.1 Avaliação de crescimento de parte aérea e raiz

Para o teste de avaliação do desenvolvimento de plantas de feijoeiro, aplicou-se os extratos secos de cúrcuma nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e os controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) aos 20 dias após o plantio. Aos 50 dias coletaram-se as plantas, separando parte aérea da raiz para pesagem do material a fresco, sendo, posteriormente, seco em estufa a 104 °C por 24 horas para avaliação da massa seca. Para este teste não inoculou-se patógeno.

5.2.9 Testes a campo para determinação da eficiência do extrato de *C. longa*

5.2.9.1 Cultivo a campo

O cultivo a campo foi conduzido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712 m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S. As plantas de feijoeiro (IAPAR 81 – Carioca) foram semeadas em 16 de fevereiro de 2011 para o experimento 1 (época da seca) e em 19 de setembro de 2011 para o experimento 2 (época das águas) (SARTORATO et al., 1983), sendo realizado média dos experimentos 1 e 2 para avaliação da eficiência dos tratamentos.

Os experimentos constituíram-se de três blocos casualizados, sendo que cada bloco era composto por cinco parcelas, e cada parcela dentro de um bloco representava um tratamento. Cada tratamento foi constituído de área útil de quatro linhas de 1 m de comprimento cada, espaçadas 0,45 m entre si, com dez plantas viáveis por metro linear. A bordadura constava com 1 m anterior e posterior e duas linhas entre os tratamentos. Essa descrição de croqui foi aplicada tanto para a mancha angular como para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro.

Foram aplicados 400 kg ha⁻¹ de NPK (04-14-08) no sulco da semeadura (de acordo com análise de solo) e os demais tratos culturais como capinas foram realizados sempre que necessário. No experimento 1 aplicou-se por aspersão em todos os tratamentos uniformemente, na fase vegetativa V5, um homeopático de percevejo fornecido pela COOPAVEL, diluindo-se 5 gotas em 1 L de água. O controle de percevejo foi satisfatório a partir dessa aplicação, não sendo necessário outra forma de manejo.

5.2.9.2 Aplicação dos tratamentos a campo

Os tratamentos com os extratos secos de cúrcuma, não submetidos ao teste de estabilidade acelerada, foram realizadas com 1 (14 dias após a semeadura - DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações em toda a planta na concentração de 150 mg L⁻¹, além dos controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular, e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crestamento bacteriano comum. Nos extratos e no controle água foram adicionados 0,25% de adjuvante natural. O fungicida e o antibiótico foram aplicados três vezes ao longo do ciclo da cultura (aos 14, 28 e 42 DAS), conforme recomendação técnica do produto. Os tratamentos foram aplicados por aspersão em quantidade de 5 mL por planta.

Para o experimento com mancha angular, as plantas foram inoculadas com suspensão de esporos de *P. griseola* (4x10⁴ esporos mL⁻¹) preparada em água com Tween 20 (uma gota 500 mL⁻¹) a partir de uma colônia com 14 dias de idade (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000), e para o crestamento bacteriano comum, a suspensão bacteriana com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparada com solução salina (0,85% de NaCl) a partir de um isolado com 48 horas e ajustada na concentração de 5 x 10⁷ UFC mL⁻¹ (RAVA & SARTORATO, 1994). Ambos os patógenos foram inoculados separadamente três vezes na cultura, aos 3 dias após a aplicação de cada tratamento.

5.2.9.3 Avaliação da severidade a campo

A severidade da doença a campo foi avaliada em toda a planta, iniciando aos 7 dias após a última inoculação, com escala diagramática elaborada por Godoy et al. (1997) para a mancha angular (*P. griseola*) e escala descrita por Díaz et al. (2001) para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*).

Foram realizadas quatro avaliações a cada quatro dias e posteriormente procedeu-se ao cálculo da curva de progresso da doença e a determinação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para ambas as doenças, por meio da equação proposta por Campbell & Madden (1990):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i) \right]$$

n = número de avaliações;

y = intensidade da doença na i-ésima avaliação;

t = tempo no momento da i-ésima.

5.2.9.4 Avaliação da produtividade a campo

Ao final do ciclo da cultura, foram coletados dados de massa e número de grãos por planta, número de vagens e número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produtividade em Kg ha⁻¹. A umidade foi verificada e o teor ajustado para 13% em todos os tratamentos.

5.2.10 Análise estatística

5.2.10.1 Análise estatística dos testes para determinação da validade

O delineamento experimental *in vitro* e em casa de vegetação foi organizado em esquema fatorial 4x4 (quatro tempos de estabilidade acelerada a 40 °C do extrato seco de cúrcuma (0; 2; 4 e 6 meses) nas concentrações (50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹). Foram realizadas três repetições *in vitro* e cinco repetições em casa de vegetação.

Os dados foram expressos em porcentagem e transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. As análises de variância (ANAVA) foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). A comparação das médias dos tratamentos foi realizada com a aplicação do teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

5.2.10.2 Análise estatística dos testes para determinação da eficiência

Para avaliação do efeito dos extratos secos de cúrcuma, não submetidos a estabilidade acelerada, o delineamento experimental *in vitro* foi inteiramente casualizado, com 7 tratamentos, sendo o extrato nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e os controles água, adjuvante natural e fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para a germinação de esporos de *P. griseola* e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para multiplicação bacteriana de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, com três repetições cada.

Em casa de vegetação o delineamento inteiramente casualizado apresentava as concentrações do extrato de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e os controles água e fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crestamento bacteriano comum, e ambos para a variável de crescimento, com cinco repetições cada tratamento.

A campo, o delineamento foi organizado em blocos casualizados com cinco tratamentos: extrato seco de cúrcuma a 50 mg L⁻¹, aplicado 1, 2 e 3 vezes e os controles água e fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crestamento bacteriano comum, ambos com cinco parcelas, sendo que a parcela representava a repetição.

Os dados expressos em porcentagem foram transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. As análises de variância (ANAVA) foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). A comparação das médias dos tratamentos foi realizada com a aplicação do teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Formulação e determinação da validade do extrato de *C. longa*

5.3.2 Testes *in vitro* para determinação da validade do extrato de *C. longa*

5.3.2.1 Inibição da germinação de esporos

A análise de variância do efeito do extrato seco de cúrcuma submetido a estabilidade acelerada por 0, 2, 4 e 6 meses a 40 °C na estufa, sobre a germinação de esporos de *P. griseola* não foi significativa. Assim o extrato mostra-se estável em todas as concentrações durante os 6 meses, confirmando sua validade por 24 meses (Tabela 5.1).

Na literatura não constam trabalhos que relatam testes de estabilidade acelerada de extratos de plantas medicinais com finalidade de controle de doenças, entretanto, sugere-se que a composição química natural do extrato deve estar relacionada com compostos antioxidantes que favoreçam um prazo de validade

suficiente para compensar a formulação do extrato, como é o caso dos curcuminóides presentes na composição da cúrcuma.

Tabela 5.1: Germinação de esporos de *P. griseola* em função dos tratamentos com extratos secos de *C. longa* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.

Tempo (meses)	Germinação de esporos (%)				Média
	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1 ns}	200 mg L ^{-1ns}	
0 ^{ns}	63,0	71,0	85,3	78,6	74,47
2 ^{ns}	67,4	75,6	66,7	67,0	69,1
4 ^{ns}	63,0	67,6	66,0	73,3	67,4
6 ^{ns}	66,0	70,0	76,0	71,4	70,8
Média	64,8	71,0	73,5	72,5	70,4

C. V. (%) = 8,28

Tratamento seguido de ns indica não significância estatística. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$.

5.3.2.2 Inibição da multiplicação bacteriana para determinação da validade

A multiplicação bacteriana de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, no teste *in vitro*, mostrou-se significativa perante os extratos secos de cúrcuma submetidos a estabilidade acelerada por 0, 2, 4 e 6 meses a 40 °C na estufa (Tabela 5.2). As concentrações de 100 e 150 mg L⁻¹ estimularam a multiplicação bacteriana a partir do extrato com 2 meses na estufa e a 50 e 200 mg L⁻¹ apresentaram estímulo aos 2 e 4 meses, mas não diferenciaram do tempo 0 aos 6 meses. Observa-se ainda que as maiores concentrações dos extratos foram mais eficientes em reduzir a multiplicação da bactéria.

Tabela 5.2: Multiplicação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em função dos tratamentos com extratos secos de *C. longa* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.

Tempo (meses)	Concentração bacteriana (UFC mL ⁻¹ x10 ¹⁰)				Média
	50 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	150 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹	
0	537,6 Ba	201,0 Aa	178,3 Aa	258,0 Aa	295,1
2	1128,6 Bb	931,6 ABb	668,6 Ab	703,3 Ab	858,0
4	1153,3 Bb	523,6 Ab	580,3 Ab	596,0 Ab	713,3
6	836,6 Bab	839,3 Bb	569,6 Bb	109,3 Aa	588,7
Média	914,0	652,3	499,2	416,6	613,8

C. V. (%) = 29,65

Média seguida de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, difere pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$.

Dessa forma, esses resultados supõem alteração dos compostos químicos com atividade antimicrobiana direta no extrato seco de cúrcuma a partir dos 6 meses da preparação. É necessário considerar o efeito dos extratos *in vivo* para confirmar a validade, uma vez que a indução de resistência pode se manter eficiente mesmo sem atividade antimicrobiana.

5.3.3 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de *C. longa*

5.3.3.1 Avaliação da severidade de *P. griseola* para determinação da validade

A severidade da mancha angular do feijoeiro não foi significativa para a 3ª folha trifoliolada tratada com extratos secos de cúrcuma, submetidos a estabilidade acelerada, e inoculada com esporos de *P. griseola*, em condições de casa de vegetação, indicando a estabilidade do extrato de cúrcuma por 24 meses (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Severidade da mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extrato seco de *C. longa* submetido ao processo de estabilidade acelerada.

Severidade (%) 3ª Folha					
Tempo (meses)	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	Média
0 ^{ns}	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
2 ^{ns}	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1
4 ^{ns}	0,2	0,2	0,1	0,05	0,1
6 ^{ns}	0,2	0,2	0,2	0,05	0,1
Média	0,1	0,2	0,1	0,07	0,18
C. V. (%) = 79,05					
Severidade (%) 4ª Folha					
Tempo (meses)	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	Média
0 ^{ns}	0,03	0	0,06	0	0,02
2 ^{ns}	0	0	0	0	0
4 ^{ns}	0,01	0	0	0	0
6 ^{ns}	0	0	0	0	0
Média	0,01	0	0,01	0	0,007
C. V. (%) = 53,56					

Tratamento seguido de ns indica não significância estatística. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. Ensaio realizado em casa de vegetação. Tratamentos aplicados na 3ª folha três dias antes da inoculação com *P. griseola* que ocorreu nas 3ª e 4ª folhas.

Para a 4ª folha trifoliolada do feijoeiro, apenas inoculada com esporos de *P. griseola*, a avaliação de severidade manteve o comportamento de estabilidade, já descrita no teste *in vitro* para este patógeno fúngico, confirmando a validade de 24 meses desse extrato (Tabela 5.3).

5.3.3.2 Avaliação da severidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* para determinação da validade

A severidade do crestamento bacteriano comum na 3ª folha trifoliolada do feijoeiro, tratado com extratos secos de cúrcuma submetidos a estabilidade acelerada por 0, 2, 4 e 6 meses, mostrou-se significativa para as concentrações de 50, 100 e 150 mg L⁻¹, os quais mantiveram a eficiência até o tempo de 4 meses na estufa, demonstrando que a validade do extrato, nestas concentrações, estende-se por 18 meses. A partir desse período, sugere-se aumentar a dosagem para 200 mg L⁻¹, pois essa concentração mantém-se estável por 24 meses.

Tabela 5.4: Severidade do crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *C. longa* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.

Severidade (%) 3ª Folha					
Tempo (meses)	50 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	150 mg L ⁻¹	200 mg L ^{-1ns}	Média
0 ^{ns}	4,9 a	5,4 a	3,8 a	7,1	5,3
2 ^{ns}	3,6 a	3,5 a	2,8 a	7,7	4,4
4 ^{ns}	5,0 a	3,3 a	2,9 a	4,7	3,9
6	11,6 Bb	20,3 Cb	11,7 Bb	6,6 A	12,5
Média	6,2	8,1	5,3	6,5	6,52
C. V. (%) = 30,77					
Severidade (%) 4ª Folha					
Tempo (meses)	50 mg L ⁻¹	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	Média
0 ^{ns}	0,2 a	0,4	0,1	0,03	0,1
2 ^{ns}	0 a	0,2	0,1	0,3	0,1
4 ^{ns}	0,06 a	0,1	0,04	0	0,05
6	3,6 Bb	0,4 A	0,4 A	0,06 A	1,1
Média	0,9	0,2	0,1	0,09	0,39
C. V. (%) = 66,40					

Média seguida de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, difere pelo teste de Tukey a 5%. Tratamento seguido de ns indica não significância estatística. Dados transformados por $\sqrt{x+5}$. Ensaio realizado em casa de vegetação. Tratamentos aplicados na 3ª folha três dias antes da inoculação com *P. griseola*, que ocorreu na 3ª e 4ª folha.

A severidade do crestamento bacteriano comum para a 4ª folha do feijoeiro mostrou-se significativa apenas para a concentração de 50 mg L⁻¹ aos 6 meses de estabilidade acelerada, sugerindo que a partir dos 18 meses de validade, a eficiência e o efeito sistêmico será garantida apenas nas concentrações acima de 100 mg L⁻¹ (Tabela 5.4).

A severidade do crestamento bacteriano comum, para a 3ª e 4ª folha, demonstram que a eficiência sobre essa doença é independente da atividade antimicrobiana direta, e que os compostos químicos desse extrato de cúrcuma tiveram efeito nos testes *in vitro*, não mantendo o mesmo padrão de resposta *in vivo*.

Os resultados obtidos com os extratos secos de cúrcuma submetidos a estabilidade acelerada sugerem constância quando testados para a mancha angular do feijoeiro (*P. griseola*), tanto nos testes *in vitro* como *in vivo*. Por outro lado, quando testados para o crestamento bacteriano comum (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*), compostos que apresentam atividade antimicrobiana direta a partir dos 6 meses de formulação (24 meses de validade) nos testes em casa de vegetação tiveram a eficiência mantida apenas até os 18 meses da formulação.

Em suma, destaca-se que para a mancha angular do feijoeiro, a validade do extrato de cúrcuma é de 24 meses, e quando se visa controlar o crestamento bacteriano comum a validade é de 18 meses a partir da data de formulação. Ressalta-se ainda que a validade do extrato seco de cúrcuma apresenta-se prolongada, podendo estar relacionada com compostos antioxidantes presentes no extrato do rizoma (MIQUEL et al., 2002) que se igualam a eficiência da vitamina C (JAYAPRAKASHA, JAGANMOHAN RAO & SAKARIAH, 2006).

5.3.4 Testes *in vitro* para determinação da eficiência do extrato de *C. longa*

5.3.4.1 Inibição da germinação de esporos

A germinação de esporos de *P. griseola* foi reduzida significativamente em 26% na concentração de 50 mg L⁻¹, quando comparado a testemunha água (0), não diferenciando do efeito do fungicida. As demais concentrações do extrato não diferenciaram da testemunha e o adjuvante natural não diferenciou da água, propondo sua incorporação a calda de aplicação dos extratos de cúrcuma nos testes *in vivo* (Figura 5.1).

Semelhantemente, o trabalho de Balbi-Peña et al. (2006a) indicou que os extratos de cúrcuma (*C. longa*) a 10% e 15% não autoclavados inibiram em 38,2% e 23,2%, respectivamente, o crescimento micelial e 71,7% e 87%, respectivamente, a esporulação de *Alternaria solani*.

Para Amaral e Bara (2005), o extrato aquoso a 1% de cúrcuma inibiu o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* em 61,2% e de *Rizoctonia solani* em 61,1%. A atividade antifúngica de cúrcuma também é relatada por Sindhu et al. (2011), os quais testaram o óleo essencial das folhas de cúrcuma sobre a produção de aflatoxina B1 e G1 do fungo *Aspergillus flavus* e observaram que a concentração de 1 e 1,5% do óleo essencial inibiu em 95,3 e 100% a produção de ambas as toxinas.

A atividade antimicrobiana dos produtos naturais, como o extrato seco de cúrcuma testado neste trabalho, o viabiliza para testes de controle alternativo por meio da indução dos mecanismos de defesa das plantas. Compostos secundários das plantas medicinais podem desempenhar funções importantes em interações planta-patógeno (SCHWAN-ESTRADA et al., 2010).

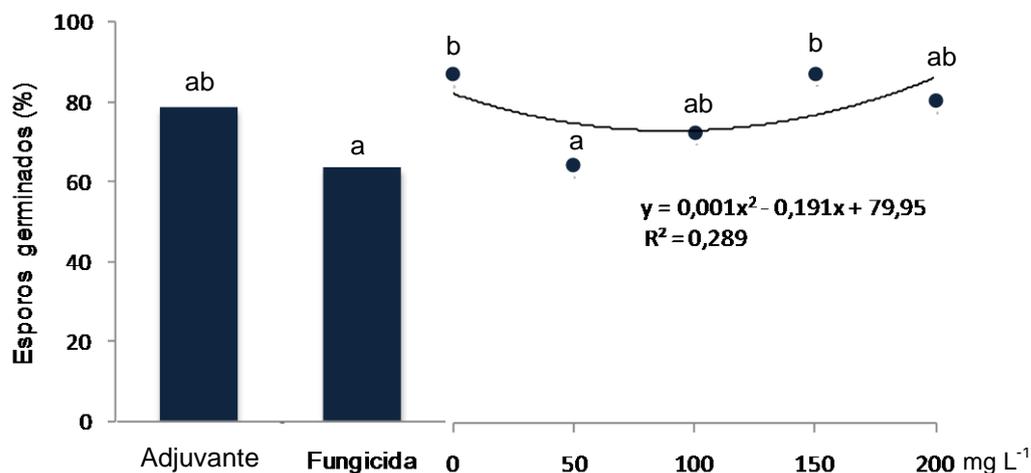


Figura 5.1: Percentual de germinação de esporos de *P. griseola* em função do tratamento com extratos secos de *C. longa* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$.

5.3.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana

A multiplicação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi reduzida significativamente nas maiores concentrações (100, 150 e 200 mg L⁻¹) do extrato de cúrcuma, quando comparados a testemunha água (0), não diferenciando do antibiótico. A concentração de 50 mg L⁻¹ não diferenciou da testemunha, mas apresentou tendência de atividade antimicrobiana. O adjuvante foi estatisticamente igual à água, citando-o com potencial para acrescentar aos extratos de cúrcuma nos testes *in vivo* (Figura 5.2).

O uso de extratos aquosos de cúrcuma também tem sido estudado no controle da bactéria *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*. O uso de extrato aquoso de quatro genótipos de cúrcuma provenientes de cultivos de Jaboticabal-SP, Mara Rosa-GO, Maringá-PR e Mercedes-PR, causou inibição completa da multiplicação da bactéria na concentração de 10% para o material proveniente de Mercedes, enquanto que para a cúrcuma de Jaboticabal houve controle total a 15% e de Mara Rosa a 20%. A cúrcuma proveniente de Maringá não inibiu completamente o crescimento em nenhuma das concentrações utilizadas (KUHNS et al., 2006).

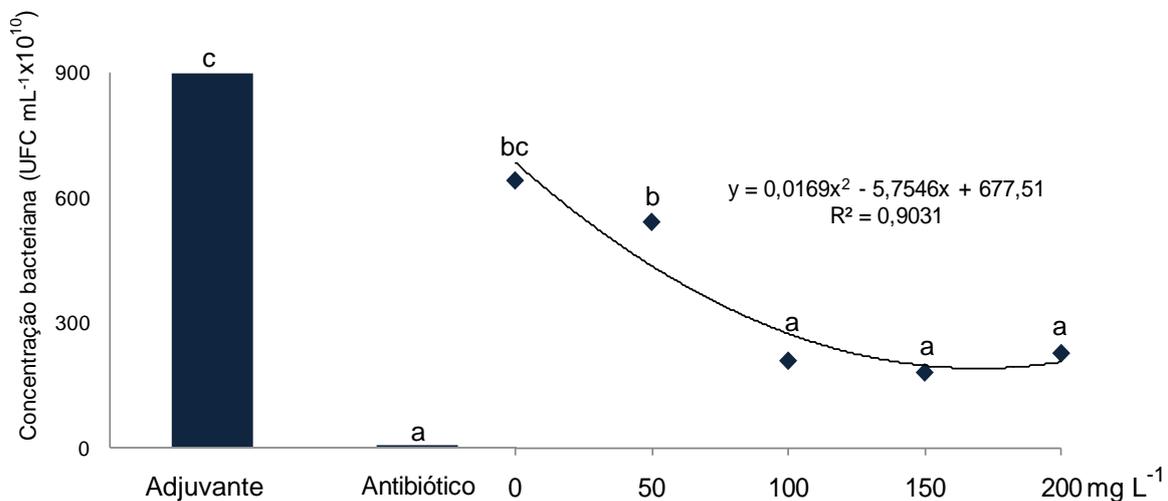


Figura 5.2: Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em função do tratamento com extratos secos de *C. longa* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%.

Da mesma forma, Jabeen et al. (2011) relataram que extratos aquosos obtidos por infusão do rizoma de cúrcuma na concentração de 1% causaram inibição

in vitro de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, atingindo um halo de inibição de 28,4 cm de diâmetro, se igualando ao efeito da estreptomicina.

Esses resultados *in vitro* publicados ressaltam a atividade antimicrobiana de cúrcuma encontrado no presente trabalho, sobre a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, o que, agregado ao efeito *in vivo*, pode maximizar o manejo da doença pela indução de resistência e pela atividade antimicrobiana direta.

5.3.5 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de *C. longa*

5.3.5.1 Avaliação da severidade para determinação da eficiência

5.3.5.1.1 Avaliação da severidade de *P. griseola* para determinação da eficiência

A severidade da mancha angular do feijoeiro, em condições de casa de vegetação foi reduzida de forma significativa tanto para a 3ª folha trifoliolada tratada com extratos secos de cúrcuma e desafiadas com *P. griseola*, quanto para a 4ª folha apenas inoculada, com redução da severidade da doença em todas as concentrações testadas, diferenciando da testemunha água (0) e apresentando o mesmo efeito do fungicida. O comportamento observado na 4ª folha respalda o efeito sistêmico desses extratos (Tabela 5.5).

A eficiência do extrato de cúrcuma na redução da severidade de doenças fúngicas também é relatada por Balbi-Peña et al. (2006b), os quais descrevem que os extratos brutos aquosos de cúrcuma a 1% e curcumina 50 mg L⁻¹ apresentaram melhor nível de controle, com valor de AACPD da pinta preta, causada por *Alternaria solani*, estatisticamente menor do que a testemunha e similar ao tratamento com fungicida cúprico, ressaltando o potencial do extrato de cúrcuma para o controle de doenças em plantas.

Extratos aquosos do rizoma de gengibre (*Zingiber officinale* R.), planta da mesma família botânica da cúrcuma, apresentaram redução da AACPD semelhante ao fungicida azoxistrobina, quando aplicados a cada 15 dias nas concentrações de 15, 25, 35 e 45% em plantas de inhame (*Dioscorea cayennensis*) para o controle da queima das folhas, causadas pelo fungo *Curvularia eragrostidis* (BRITO, 2009).

Para a cultura da alface, verificou-se que a aplicação de massa de gengibre na base da planta aumentou a atividade da enzima peroxidase e reduziu a

incidência de *Sclerotinia sclerotiorum*. A presença de compostos elicitores no extrato aquoso bruto de gengibre nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 25% foi observada pela indução da produção de fitoalexinas em sorgo e soja, que ocorreu de maneira dose dependente. Dessa forma, a atividade do gengibre ocorreu tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela ativação de mecanismos de defesa das plantas (RODRIGUES et al., 2007).

Tabela 5.5: Severidade e percentual de controle da mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *C. longa* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas.

Tratamentos	Severidade (%)			
	3ª Folha	Controle (%)	4ª Folha	Controle (%)
0	3,3 b	-	0,5 b	-
50 mg L ⁻¹	0,1 a	97,0	0,03 a	94,0
100 mg L ⁻¹	0,1 a	97,0	0 a	100
150 mg L ⁻¹	0,2 a	94,0	0,07 a	99,5
200 mg L ⁻¹	0,1 a	97,0	0 a	100
Fungicida	0,2 a	94,0	0,03 a	94,0
Regressão	y = 0,000x ² - 0,048x + 2,97		y = 3E-05x ² - 0,007x + 0,476	
R ²	0,842		0,820	

Médias seguidas de letra distinta diferem pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹).

5.3.5.1.2 Avaliação da severidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* para determinação da eficiência

Os extratos secos de cúrcuma reduziram significativamente a severidade do crestamento bacteriano comum em feijoeiro, tanto para a 3ª folha tratada e inoculada com a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, quanto para a 4ª folha apenas inoculada, demonstrando que o efeito do controle é local e sistêmico, da mesma forma que o antibiótico (Tabela 5.6).

Com resultados contraditórios, Kuhn et al. (2006) observaram atividade antimicrobiana direta *in vitro* de extratos de cúrcuma a 10 e 20% sobre *X. axonopodis* pv. *manihotis*, dependendo da procedência dos rizomas. No entanto, *in vivo*, nas concentrações utilizadas, não houve efeito curativo em manivas de mandioca infectadas com o patógeno. A literatura conta com poucos trabalhos relacionados a atividade indutora de resistência de cúrcuma em bacteriose, contudo, suficiente para observar a especificidade de resposta para os diferentes patossistemas.

Tabela 5.6: Severidade e percentual de controle do cretamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *C. longa* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas.

Tratamentos	Severidade (%)			
	3ª Folha	Controle (%)	4ª Folha	Controle (%)
0	14,5 b	-	6,8 b	-
50 mg L ⁻¹	4,9 a	66,3	0,2 a	97,1
100 mg L ⁻¹	5,4 a	62,7	0,4 a	94,2
150 mg L ⁻¹	3,8 a	73,8	0,1 a	98,5
200 mg L ⁻¹	7,0 a	51,8	0,03 a	99,6
Antibiótico	2,7 a	81,4	1,7 a	75,0
Regressão	$y = 0,000x^2 - 0,167x + 13,73$		$y = 0,000x^2 - 0,099x + 6,08$	
R ²	0,889		0,845	

Médias seguidas de letra distinta diferem pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$. Antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina)

Com resultados contraditórios, Kuhn et al. (2006) observaram atividade antimicrobiana direta *in vitro* de extratos de cúrcuma a 10 e 20% sobre *X. axonopodis* pv. *manihotis*, dependendo da procedência dos rizomas. No entanto, *in vivo*, nas concentrações utilizadas, não houve efeito curativo em manivas de mandioca infectadas com o patógeno. A literatura conta com poucos trabalhos relacionados a atividade indutora de resistência de cúrcuma em bacteriose, contudo, suficiente para observar a especificidade de resposta para os diferentes patossistemas.

Os resultados da eficiência dos extratos de cúrcuma sobre a severidade da mancha angular e do cretamento bacteriano comum no feijoeiro, em condições de casa de vegetação, sugerem a utilização da menor concentração, ou seja, de 50 mg L⁻¹, para a extensão dos testes a campo, devido a não diferença estatística entre as concentrações.

5.3.6 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro

5.3.6.1 Avaliação de crescimento de parte aérea

A massa fresca das plantas de feijoeiro tratadas com o extrato seco de cúrcuma foi significativa para as concentrações de 50, 100 e 150 mg L⁻¹, com estímulo no desenvolvimento com quando comparados a testemunha água (0). A massa seca manteve o mesmo comportamento para as concentrações de 50 e 150

mg L⁻¹. Neste último, o incremento da parte aérea foi de 152,1 e 163,7%, respectivamente (Figura 5.3).

Resultados diferentes, demonstrando a fitotoxicidade de cúrcuma são relatados por Tavares et al. (2010), os quais verificaram que os rizomas moídos de cúrcuma inibem a germinação e o crescimento de picão (*Bidens pilosa*) e o composto fitotóxico isolado e identificado foi o sesquiterpeno ar-turmerona.

Aoki et al. (1997) ressaltam que a intensidade dos efeitos de extratos de uma planta sobre o desenvolvimento de outra é dependente da concentração das substâncias testadas, o que se comprovou neste trabalho, no qual a massa fresca e seca do feijoeiro não apresenta uma relação dose dependente perante as concentrações do extrato de cúrcuma.

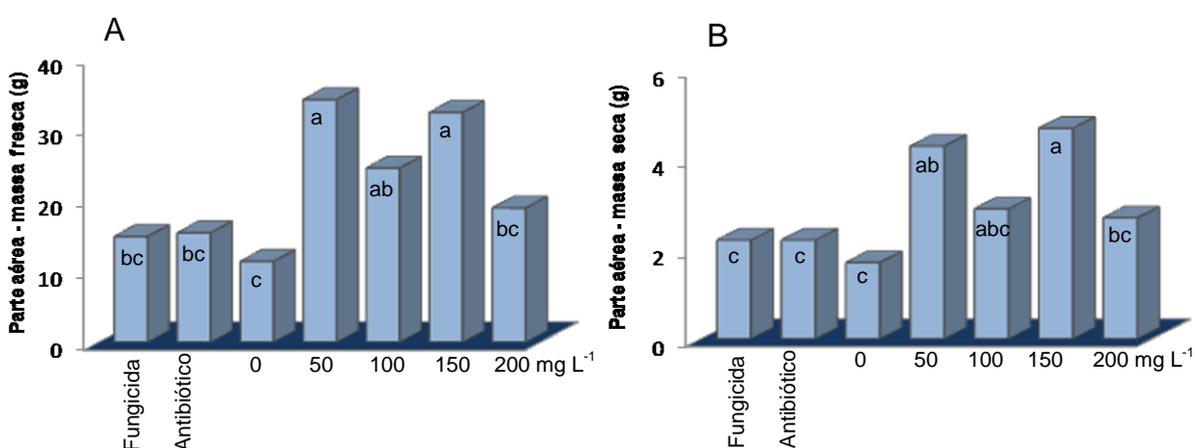


Figura 5.3: Massas fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *C. longa*, nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

5.3.6.2 Avaliação de crescimento de raiz

A avaliação do desenvolvimento do sistema radicular foi significativo, com incremento da massa fresca e seca nas plantas de feijoeiro tratadas com os extratos secos de cúrcuma, nas concentrações de 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e 150 e 200 mg L⁻¹, respectivamente, quando comparados a testemunha. A concentração de 150 mg L⁻¹ aumentou 216,6 e 225% a massa fresca e seca da raiz, respectivamente (Figura 5.4).

Na literatura não consta trabalhos com cúrcuma sobre o desenvolvimento radicular de plantas, contudo, destaca-se o potencial de outras plantas medicinais como a sálvia (*Salvia officinalis* L.) com semelhante efeito sobre o comprimento da raiz, estimulado na ordem de 86, 98 e 75%, para as concentrações de 7,5; 15 e 22,5%, respectivamente, de extrato aquoso (VIECELLI & CRUZ-SILVA, 2009). Efeito este verificado também por Piesanti e Jacobi (2004) em bioensaios realizados com folhas e raízes de *Ateleia glazioviana* (timbó) testadas em sementes de alface.

Resultados contrários são descritos por Alves et al. (2004) utilizando extratos de uma espécie da família Lamiaceae, o alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* C.) sobre a germinação e crescimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.), que observaram efeito inibitório no comprimento da raiz o qual foi proporcional à concentração do extrato. Para Souza, Rodrigues & Rodrigues (1997), a raiz é um indicador mais sensível do que a germinação aos extratos aquosos, destacando que esta variável é um aspecto ecológico importante, uma vez que a inibição do sistema radicular seria determinante, pois impediria o desenvolvimento normal da planta afetada pelos compostos químicos e representaria o potencial competitivo entre as plantas.

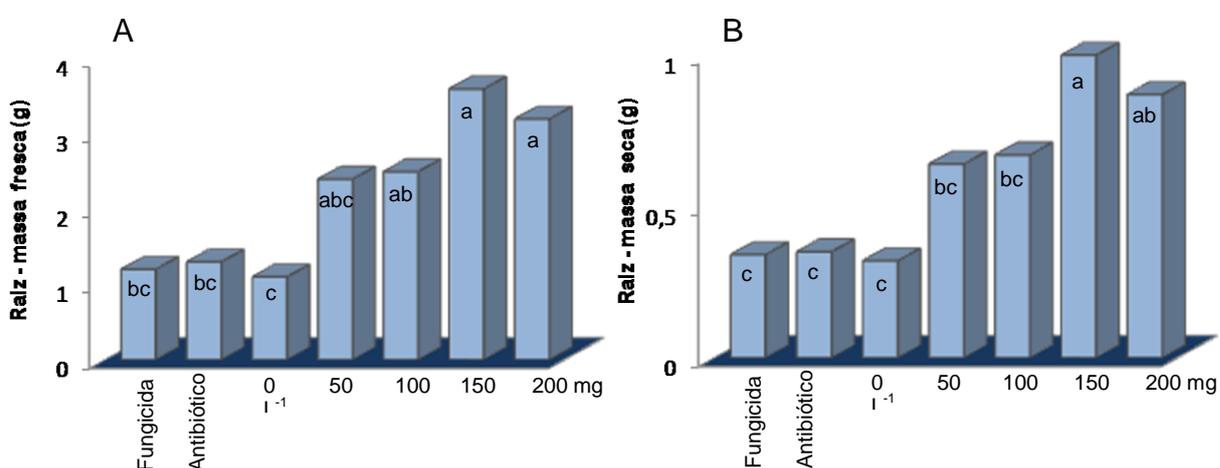


Figura 5.4: Massas fresca (A) e seca (B) da raiz de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *C. longa* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

5.3.7 Testes a campo para determinação da eficiência do extrato de *C. longa*

5.3.7.1 Avaliação da severidade a campo

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a mancha angular do feijoeiro, foi reduzida com 1, 2 e 3 aplicações com extrato seco de cúrcuma na concentração de 50 mg L⁻¹, quando comparada a testemunha água e não diferenciando do fungicida. Com comportamento semelhante, houve redução da AACPD do crestamento bacteriano comum quando comparado à água e com o mesmo afeito atingido pelo antibiótico (Tabela 5.7).

Resultados semelhantes foram encontrados por Balbi-Peña et al. (2006b) que verificaram menor área abaixo da curva de progresso da doença na folha de tomateiro tratada e não tratada com o extrato aquoso do rizoma de cúrcuma a 10%, promovendo uma possível indução de resistência sistêmica contra *A. solani*.

Tabela 5.7: Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de cúrcuma (*C. longa*) na concentração de 50 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0), fungicida ou antibiótico e desafiadas com *P. griseola* ou *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Tratamentos	AACPD	
	<i>P. griseola</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
Água	175 b	240,6 b
Fungicida	40,3 a	-
Antibiótico	-	35,0 a
1 aplicação	45,3 a	38,6 a
2 aplicações	30,3 a	33,3 a
3 aplicações	33,6 a	30,0 a
Média Geral	64,9	75,5
C. V. (%)	19,7	14,5

Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹). Antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina). Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

O potencial de extratos aquosos de plantas medicinais no controle de doenças também são relatados por Santos, Bonaldo & Bulhões (2011), os quais testaram extratos a 25% das plantas de arruda (*Ruta graveolens*), carqueja (*Baccharis trimera*), manjerona (*Origanum majorana*) e, das espécies florestais, eucalipto (*Corymbia citriodora*) e angelim (*Parkia pendula*) na proteção de algodão contra *Colletotrichum gossypii* e no controle curativo de ramulose (*C. gossypii* var. *cephalosporioides*) em campo. Esses autores observaram que o extrato

aquoso de arruda não foi efetivo no controle da antracnose, enquanto que os demais extratos reduziram a doença. No controle da ramulose a campo, nas cultivares LDCV03 e LDCV22, todos os extratos testados não apresentaram diferença significativa para redução da AACPD em relação à testemunha.

5.3.7.2 Avaliação da produtividade a campo

5.3.7.2.1 Avaliação da produtividade do feijoeiro desafiado com *P. griseola*

A análise de variância dos dados de produtividade obtidos de plantas tratadas com 1, 2 e 3 aplicações do extrato seco de cúrcuma a 50 mg L⁻¹, testemunha água e fungicida e desafiadas com *P. griseola*, fungo causador da mancha angular do feijoeiro, mostrou-se não significante para o número de vagens (Figura 5.5A) e número de grãos (Figura 5.5C) por planta. Porém, significativo para o número de grãos por vagem, com incremento quando aplicado extrato de cúrcuma em comparação a testemunha e não diferenciando do fungicida (Figura 5.5B).

A massa de 100 grãos foi incrementada quando as plantas de feijoeiro foram tratadas com 2 aplicações do extrato seco de cúrcuma, sendo este superior a testemunha e igual ao fungicida (Figura 5.5D).

A massa de grãos por planta (Figura 5.5E) e a produtividade (Figura 5.5F) foram significativamente maiores com 3 aplicações do extrato seco de cúrcuma e no tratamento fungicida, produzindo 57,8 e 62,2 sc ha⁻¹, respectivamente, ao passo que a testemunha produziu 45,6 sc ha⁻¹. A testemunha, 1 e 2 aplicações do extrato não diferenciaram entre si para ambas as variáveis.

De forma semelhante, o incremento na produtividade de plantas de soja tratadas com curcumina a 50 mg L⁻¹ é relatada por Becker et al. (2004), os quais observaram que o tratamento proporcionou um peso total de sementes de soja 29% maior que o obtido com o tratamento padrão com o fungicida pyraclostrobin + epoxiconazole, em ensaio para controle de doenças de final de ciclo, como *Septoria glycines*, *Cercospora kikuchi* e *Microsphaera diffusa*, em condições de campo.

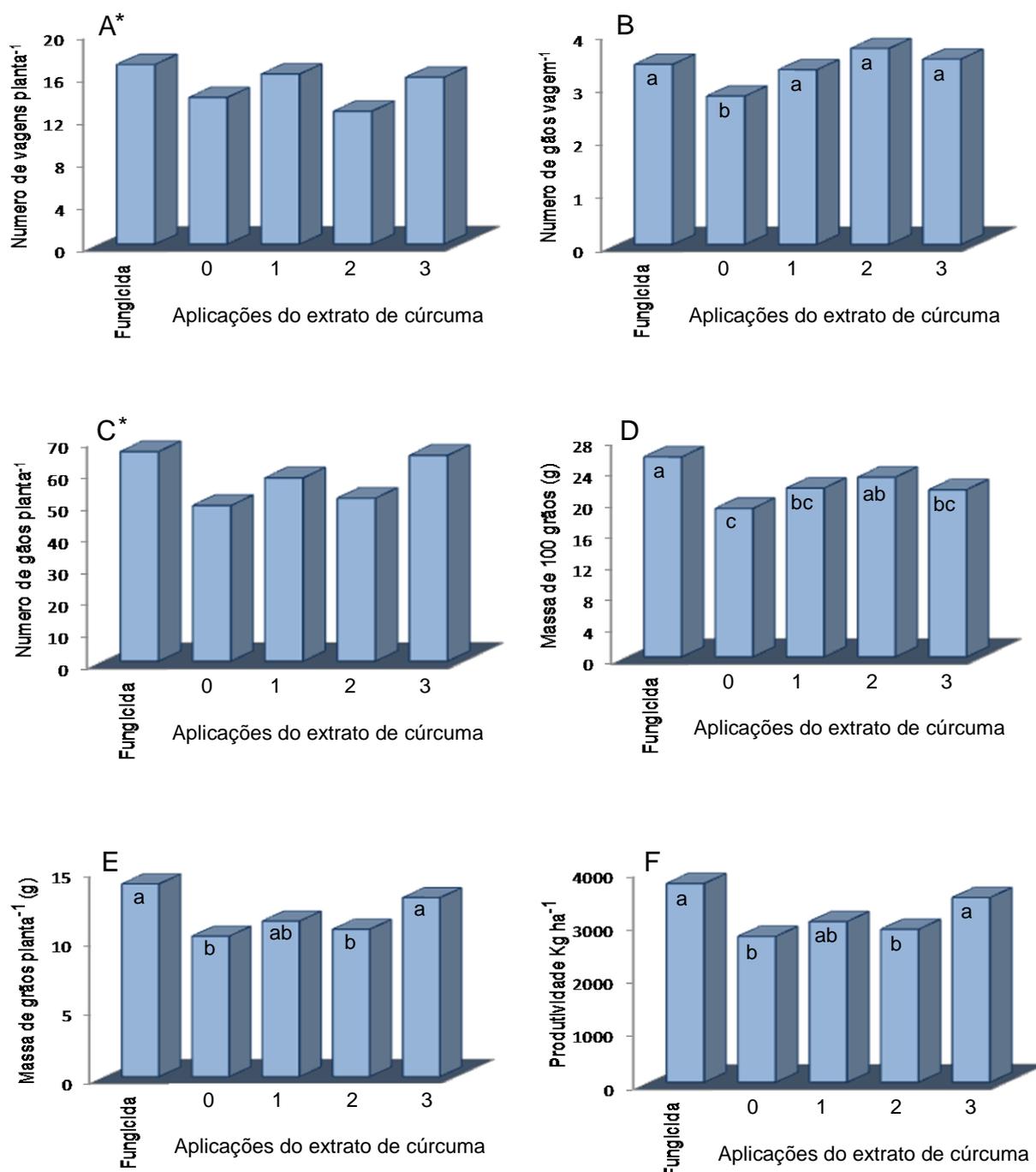


Figura 5.5: Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), número de grãos por planta (C), massa de 100 grãos (D), massa de grãos por planta (E) e produtividade (F) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de cúrcuma (*C. longa*) na concentração de 50 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0) ou fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹). As plantas foram inoculadas três vezes ao longo do ciclo da cultura com suspensão de esporos de *P. griseola* (4x10⁴ esporos mL⁻¹) aos 3 dias após a aplicação de cada tratamento. Asterisco (*) indica que não houve diferença significativa pela ANOVA ao passo que médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Para Balbi-Peña et al. (2006b), trabalhando com extrato de cúrcuma (1 e 10%), curcumina (50 e 100 mg L⁻¹), acibenzolar-S-metil (ASM) (25 mg i.a. L⁻¹), oxiclóreto de cobre (1.100 mg i.a. L⁻¹), azoxystrobin (80 mg i.a. L⁻¹) e testemunha (água) no controle da pinta preta, causada por *Alternaria solani* em tomateiro, verificaram e os extratos brutos de cúrcuma apresentaram níveis de controle de pinta preta similares ao tratamento com fungicida cúprico, mas inferior ao azoxystrobin. Não houve diferenças estatísticas na produção comercial de tomate entre tratamentos. Somente o tratamento de curcumina 50 mg L⁻¹ apresentou maior porcentagem de frutos grandes em relação à testemunha.

A produtividade de plantas de feijoeiro tratadas com 1 e 2 aplicações não diferenciaram em produtividade do tratamento testemunha, apesar de apresentar redução significativa na AACPD da mancha angular (Tabela 5.7), provavelmente a indução de resistência nas plantas exigiu uma alocação de recursos, gerando um custo adaptativo (IRITI & FAORO, 2003) associado entre defesas constitutivas e induzíveis (HEIL & BALDWIN (2002) que refletiram na produtividade do feijoeiro.

5.3.7.2.2 Avaliação da produtividade do feijoeiro desafiado com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

O número de vagens (Figura 5.6A) e o número de grãos por planta (Figura 5.6C) não foram significativos em feijoeiro tratado com 1, 2 e 3 aplicações do extrato de cúrcuma a 50 mg L⁻¹, e comparadas com a testemunha e o antibiótico, ambos inoculados com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* três dias após cada tratamento. O número de grãos por vagem obtidos de plantas tratadas com o extrato de cúrcuma não diferenciaram do antibiótico e da testemunha água (Figura 5.6B). Da mesma forma, a massa de 100 grãos foi incrementada no tratamento com 3 aplicações do extrato de cúrcuma, quando comparada com a testemunha, atingindo efeito semelhante ao antibiótico (Figura 5.6D).

A massa de grãos por planta (Figura 5.6E) e a produtividade (Figura 5.6F) do feijoeiro foram superiores quando aplicado 3 pulverizações do extrato de cúrcuma a 50 mg L⁻¹ e comparados com a testemunha. As 3 aplicações do extrato apresentaram o mesmo efeito das 3 aplicações do antibiótico, que produziram 37,2 e 39,9 sc ha⁻¹, respectivamente, ao passo que a testemunha apresentou 29,3 sc ha⁻¹, média de 21,2% inferior as 3 aplicações do extrato.

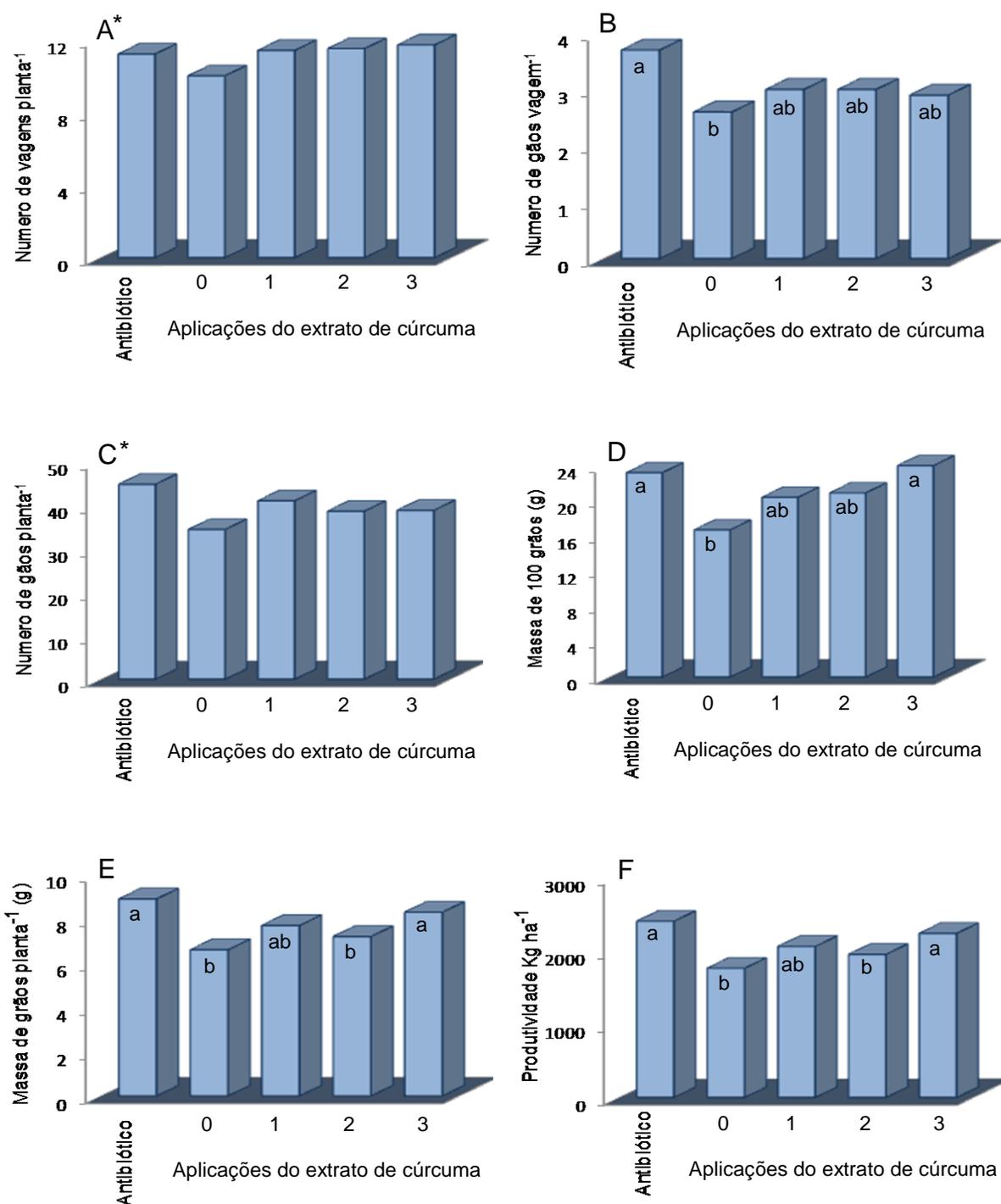


Figura 5.6: Número de vagens por planta (A), número de grãos por vagem (B), número de grãos por planta (C), massa de 100 grãos (D), massa de grãos por planta (E) e produtividade (F) de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com 1 (14 DAS); 2 (14 e 28 DAS) e 3 (14, 28 e 42 DAS) aplicações com extrato seco de cúrcuma (*C. longa*) na concentração de 50 mg L⁻¹ e comparadas com plantas que receberam 3 aplicações de água destilada (0) ou antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina). As plantas foram inoculadas três vezes ao longo do ciclo da cultura com suspensão bacteriana de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (5 x 10⁷ UFC mL⁻¹) aos 3 dias após a aplicação de cada tratamento. Asterisco (*) indica que não houve diferença significativa pela ANOVA ao passo que médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Kuhn (2007), trabalhando com o patossistema feijoeiro e crestamento bacteriano comum, tratados com indutor químico (acibenzolar-S-metil - ASM) e biológico (*Bacillus cereus*), observou que o ASM induziu resistência pelo aumento de enzimas chaves como peroxidase, quitinase, β -1,3-glucanase, protease, lignina, proteínas solúveis e açúcares redutores e redução no teor de fenóis, amido, crescimento e produtividade, ao passo que o indutor biótico proporcionou aumento na atividade de peroxidase e amido e reduziu o teor de proteínas nas folhas e grãos, sem interferir no crescimento e na produtividade, destacando que a indução de resistência deve equilibrar a distribuição de recursos energéticos na planta para ser vantajosa e não interferir no aspecto produtivo da cultura.

No presente trabalho, observou-se que o extrato seco de cúrcuma a 50 mg L⁻¹ aplicado uma e duas vezes ao longo do ciclo da cultura não diferenciou do tratamento testemunha em nenhuma das variáveis avaliadas de produtividade do feijoeiro desafiado com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, possivelmente pelo investimento dos limitados recursos na produção de defesas constitutivas (COLEY et al., 1985) ao invés de apresentar custo apenas na presença do patógeno (HEIL, 2002). Dessa forma, é importante que o produto/extrato indutor de resistência mantenha o mecanismo latente de defesa na planta para que os recursos energéticos sejam destinados para a expressão da defesa somente em condições necessárias (BOSTOCK, 2005), o chamado priming.

O mecanismo latente de defesa nas plantas faz parte dos processos morfogênicos e evolutivos relacionados à adaptação e seleção. Interações extremamente complexas regulam a convivência dos indivíduos em uma população vegetal (LARCHER, 2000) e possivelmente surgiu devido a relativa imobilidade das plantas no ambiente terrestre (HARTMANN et al., 2002), deixando-as mais suscetíveis a predadores e doenças e exigindo o desenvolvimento de mecanismos de defesa.

Em consideração, ressalta-se que para o controle da mancha angular do feijoeiro (*P. griseola*) e crestamento bacteriano comum (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*), em condições de campo, o extrato seco de cúrcuma a 50 mg L⁻¹ apresenta potencial no controle dessas doenças quando aplicado três vezes ao longo do ciclo da cultura, em intervalos de 14 dias, garantindo a produtividade de forma semelhante ao controle químico, além de respeitar o meio ambiente ao substituir o agrotóxico pelo extrato natural.

Além da opção no controle de doenças do feijoeiro, sugere-se o cultivo de cúrcuma como alternativa de produção para suprir a demanda de substrato do formulado seco, podendo, inclusive, ser utilizada na rotação de cultura da propriedade rural. O cultivo de cúrcuma é realizado pela propagação dos rizomas enterrados de 10 a 15 cm de profundidade, espaçados em fileiras simples de 20-40 cm entre plantas e 50 cm entre linhas. O plantio deve ser feito nos meses de outubro a novembro e os rizomas são colhidos quando a parte aérea começa a secar, geralmente após 7 meses, podendo produzir até 10 toneladas de tubérculos por ha ano⁻¹. É uma planta de pleno sol e tolera geada (RIBEIRO & DINIZ, 2008).

5.4 CONCLUSÃO

O extrato seco de cúrcuma mostra-se estável por 24 meses para o patossistema mancha angular do feijoeiro, enquanto para o crestamento bacteriano comum a validade é de 18 meses a partir da data de formulação. A concentração de 50 mg L⁻¹ inibiu a germinação de *P. griseola* e 100, 150 e 200 mg L⁻¹ inibiram a multiplicação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Todas as concentrações reduziram a severidade das doenças em casa de vegetação e tenderam a estimular a massa fresca e seca da parte aérea e da raiz do feijoeiro. O controle das doenças testadas relaciona-se com a atividade antimicrobiana direta e provavelmente com a ativação dos mecanismos de defesa no feijoeiro.

A campo, a concentração de 50 mg L⁻¹, a menor das concentrações que se destacaram em casa de vegetação na redução da severidade, foi aplicada 1, 2 e 3 vezes ao longo do ciclo da cultura em intervalos de 14 dias, e reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença, sendo que a produtividade foi superior a testemunha e semelhante ao controle químico apenas quando aplicado três vezes, para ambas as doenças.

Dessa forma, o extrato seco formulado de cúrcuma mostra-se viável para o controle da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. C. S.; FILHO, S. M.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.

AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.2, Suplemento, p.5-8, 2005.

AOKI, T.; OHRO, T.; HIRAGA, Y. SUGA, T.; UNO, M.; OHTA, S. Biologically active clerodane-type diterpene glycosides from the root-stalks of *Dicranopteris pedata*. **Phytochemistry**, New York, v.46, n.5, p.839-844, 1997.

APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, p.163-169, 1995.

ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M.E.F.; GOMES-CARDOSO, L.; LEON, L.L. Studies on de effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.6, p.791-794, 1999.

ARAUJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.5, p.723-728, 2001.

ASSIS, R.L. Agroecologia: visão histórica e perspectiva no Brasil. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. **Agroecologia princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. Brasília, DF.:Embrapa, p.174-176, 2005.

AZEVEDO, L.A.S. **Fungicidas protetores: fundamentos para o uso racional**. São Paulo: LASA Suporte em Proteção de Plantas, 320p. 2003.

BALASUBRAMANYAM, M.; KOTESWARI, R.S.; MONICKRARAJ, S.F.; MAHESWARI, J.U.; MOHAN, V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. **Journal of Biosciences**, v.28, n.6, p.715-721, 2003.

BALBI-PEÑA, M.I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina – I. avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.3, p.310-314, 2006a.

BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina – II Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.4, p.401-404, 2006b.

BECKER, A.; VIGO-SCHULTZ, S.C.; STANGARLIN, J.R.; BALBI-PEÑA, M.I.; KLAHOLD, C.A. & SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle alternativo das doenças de final de ciclo e oídio na cultura da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, (Suplemento), p.163, 2004.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa, MG: Editora UFV, p.13-18, 2006.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**. v.42, p.545-580. 2005.

BRITO, N.M. Alternativas de controle da queima das folhas do inhame (*Dioscorea cayennensis*). Tese de doutorado em agronomia da Universidade Federal da Paraíba, Areia:PB, 88p, 2009.

CECÍLIO FILHO, A.B. **Época e densidade de plantio sobre a fenologia e rendimento da cúrcuma (*Curcuma longa* L.)**. Tese de Doutorado em Agronomia. Universidade Federal de Lavras: Lavras, 120p. 1996.

COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN III, F. S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v.230, p.895-899, 1985.

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

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 66p. 2000.

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

GODOY, C.V.; CARNEIRO, S.M.T.P.G; IMAUTI, M.T.; DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGER, R.D.; BERGAMIN FILHO, A. Diagrammatic scales dor bean diseases: development and validation. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.104, n.4, p.336-345, 1997.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR. F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7ª ed. New Jersey: Prentice Hall, 880p. 2002.

HEIL, M. Ecological costs of induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**. v.5, p.1-6, 2002.

HEIL, M.; BALDWIN, I.T. Fitness cost of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**. v.7, p.61-67. 2002.

IBGE – **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v.24, n.12. 82p. 2011.

IRITI, M.; FAORO, F. Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? **Journal of Plant Pathology**. v.85, n.4(special issue), p.265-270. 2003.

JABEEN, R.; ASHRAF, M.; AHMAD, I.; IFTIKHAR, T. Purification and bioassays of bioactive fraction from *Curcuma longa* against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing BLB disease in rice. **Pakistan Journal of Botany**. v.43, n.2, p.1335-1342, 2011.

JAYAPRAKASHA, G.K.; JAGANMOHAN RAO, L.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, **Food Chemistry**, v.98, n.4, p.720-724, 2006.

KUHN, O.J.; PORTZ, R.L.; STANGARLIN, J.R.; MONTALVÁN, R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**. v.27, n.1, p.13-20, 2006.

KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção. Tese de doutorado: ESALQ, 140p, 2007.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 531p. 2000.

LIN, J.K.; LIN-SHIAU, S.Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China**. Part B, Life Sciences, v.25, n.2, p.59-66, 2001.

MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p.49-52, 2000.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. Isolamento de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p.27-35, 2000.

MAZUMDER, A.; RAGHAVAN, K.; WEINSTEIN, J.; KOHN, K.W. & POMMIER, Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. **Biochemical Pharmacology**, v.49, n.8, p.1165-1170, 1995.

MIQUEL, J.; BERND, A.; SEMPERE, J.M.; DÍAZ-ALPERI, J.; RAMÍREZ, A. The curcuma antioxidant: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.34, n.1, p.37-46, 2002.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In.: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Volume 1: princípios e conceitos. 4.ed., Piracicaba: Agronômica Ceres, p.593-633, 2011.

PAULA JUNIOR, T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR. T. J.; BORÉM, A. (Eds). **Feijão**. 2ª ed. Viçosa: UFV, p. 415-436, 2006.

PIESANTI, R.; JACOBI, S. U. **Avaliação do potencial alelopático de folhas e raízes de *Ateleia glazioviana* (timbó) nas quatro estações do ano**. XII Seminário de Iniciação Científica, Ijuí, 2004.

PIESANTI, R.; JACOBI, S. U. **Avaliação do potencial alelopático de folhas e raízes de *Ateleia glazioviana* (timbó) nas quatro estações do ano**. XII Seminário de Iniciação Científica, Ijuí, 2004.

RAVA, C.A, SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: Sartorato A, Rava CA (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Embrapa: Brasília, p.217-242. 1994.

RIBEIRO, P.G.F.; DINIZ, R.C. **Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 218p. 2008.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.124-128, 2007.

SANTOS, B.T.; BONALDO, S.M.; BULHÕES, C.C. Proteção de algodão contra *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por extratos aquosos de plantas medicinais e de espécies florestais. **Enciclopédia Biosfera: Goiânia**, v.7, n.13, p.862-873, 2011.

SARTORATO, A.; AQUINO, A.R.L.; CONTO, A.J.; SILVEIRA FILHO, A.; SEIJAS, C.A.R.; OLIVEIRA, I.P.; KLUTHCOUSKI, J.; ROCHA, J.A.M.; YOKOYAMA, M.; SILVEIRA, P.M.; GUAZZELLI, R.J. **Recomendações técnicas para a cultura de feijão com irrigação suplementar**. 2ª edição. Goiânia: Embrapa-CNPAP, 21p. (Circular técnica, 16). 1983.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G. Uso de princípios ativos de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Horticultura Brasileira**, v.28, n.2, p.121-127 (Suplemento), 2010.

SINDHU, S.; CHEMPAKAM, B.; LEELA, N.K. BHAI, R.S.; Chemoprevention by essential oil of turmeric leaves (*Curcuma longa* L.) on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Food and Chemical Toxicology**. n.49, v.5, p.1188-1192, 2011.

SOUZA, A. P. S. F.; RODRIGUES, R. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. Efeito do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.32, n.2, p.165-170, 1997.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.11, p.16-21, 1999.

STANGARLIN, J.R, PASCHOLATI, S.F, LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.1, p.59-66, 2000.

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. Evidência de custo adaptativo da resistência induzida por ASM e extratos de plantas medicinais em tomateiro fertirrigado. **Summa Phytopathologica**, v.35, (Suplemento), p.1-3, 2009.

STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.S. Estratégias de seleção e uso de extratos de plantas no controle microbiano *in vitro*. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 1ª ed. Brasília/DF: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, p.293-345, 2010.

SURH, Y.J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.1091-1097, 2002.

TAVARES; W.S.; SILVA, I.M.; OLIVEIRA, C.S.; PETACCI, F.; FREITAS, S.S.; MORENO, M.I.C. Atividade fitotóxica e isolamento do sesquiterpeno ar-turmerona de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae). **Anais.. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**, Ribeirão Preto: SP. p.3410-3413, 2010.

UECHI, S.; MIYAGI, Y.; ISHIMINE, Y.; HONGO, F. Antibacterial activity of essential oils from *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) cultivated in Okinawa against foodborne pathogenic bacteria. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, v.44, n.2, p.138-140, 2000.

VALE, F.X.R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum: doenças da parte aérea causada por fungos. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, v.1, p.341-350, 1997.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT – A software for plant disease severity assessment. **8th International Congress of Plant Pathology**, 105p. 2003.

VIECELLI, C.A; CRUZ-SILVA, C.T.A. Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.1, p.39-46, 2009.

6 CAPÍTULO III - FORMULAÇÃO DE EXTRATO DE *Pycnoporus sanguineus* PARA O CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM FEIJOEIRO

RESUMO

O feijoeiro é uma cultura de grande importância econômica, porém doenças fúngicas como a mancha angular causada por *Pseudocercospora griseola* e bacteriana incitada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* comprometem a produtividade. Com o objetivo de desenvolver métodos alternativos para o controle destas doenças, formulou-se um extrato seco de *Pycnoporus sanguineus*, determinando-se o seu prazo de validade e verificando-se a sua eficiência *in vitro* e *in vivo*. O extrato foi usado nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, além da testemunha água, e os controles químicos fungicida (azoxystrobin 40 mg i.a. L⁻¹) para os ensaios com mancha angular e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para o crestamento bacteriano comum. Os resultados indicaram que para mancha angular nos testes *in vitro* e *in vivo*, a validade é de 24 meses para o extrato seco de *P. sanguineus* na menor concentração (50 mg L⁻¹). Para o crestamento bacteriano comum, essa mesma concentração do extrato se restringe a 12 meses, contudo a concentração de 200 mg L⁻¹ manteve estabilidade de 24 meses. A atividade antimicrobiana indica redução de 24,5% na germinação dos esporos de *P. griseola* na concentração de 100 mg L⁻¹ e inibição da multiplicação bacteriana em todas as concentrações do extrato. Em casa de vegetação, os extratos estimularam o desenvolvimento da parte aérea e radicular de plantas de feijoeiro, mas a severidade da mancha angular não foi reduzida. Para o crestamento bacteriano comum, os extratos apresentaram ação sistêmica para o controle dessa doença. Estes resultados indicam o potencial do extrato seco de *P. sanguineus* para o controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro.

Palavras-chave adicionais: Polyporaceae, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudocercospora griseola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, mancha angular, crestamento bacteriano comum.

6 CAPÍTULO III - FORMULATION OF *Pycnopus sanguineus* EXTRACT FOR ALTERNATIVE CONTROL OF BEAN DISEASES

ABSTRACT

The bean is a very important crop, but the diseases caused by *Pseudocercospora griseola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* compromise the productivity. Aiming to develop alternative methods to control these diseases was formulated a dry extract of *Pycnopus sanguineus*, and determined its validity and its *in vitro* and *in vivo* efficiency. The extracts were used at concentrations of 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹, and the control water, and chemical controls with fungicide (azoxystrobin 40 mg L⁻¹) for angular leaf spot and antibiotic (22.5 mg L⁻¹ + oxytetracycline 225 mg L⁻¹ streptomycin) to bacterial blight. The results showed that to angular leaf spot of bean, with *in vitro* and *in vivo* assays the validity of the dry extract of *P. sanguineus* at lowest concentration (50 mg L⁻¹) was 24 months. For bacterial blight, this same concentration the validity is limited to 12 months, however the concentration of 200 mg L⁻¹ remained its efficiency for 24 months. The antimicrobial activity indicated a reduction of 24.5% in germination of *P. griseola* spores at concentration of 100 mg L⁻¹, and complete inhibition of bacterial growth at all concentrations of this extract. In the greenhouse, there were no control of angular leaf spot, however, the bacterial blight severity was reduced in a systemic way. These results dry extract of *P. sanguineus* for the control of common bacterial blight.

Keywords: Polyporaceae, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudocercospora griseola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, angular leaf spot, common bacterial blight.

6.1 INTRODUÇÃO

Na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), diversos são os fatores que comprometem a produtividade, entre estes estão as doenças de diversas etiologias e que causam danos significativos, destacando-se a mancha angular e o crestamento bacteriano comum. A mancha angular, causada pelo fungo hemibiotrófico *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & Braun (sin. *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris), representa um dos principais patógenos fúngicos, manifestando-se no caule, folhas e vagens da planta. Para doenças bacterianas destaca-se o crestamento bacteriano comum, incitada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1987) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995, a qual apresenta manchas encharcadas visíveis em toda a parte aérea da planta (BIANCHINI, MARINGONI & CARNEIRO, 2005).

O controle da mancha angular tem sido feito com o emprego de cultivares resistentes, sementes livres de patógenos e aplicação de fungicidas (VALE, COSTA & ZAMBOLIM, 1997) ao passo que para o crestamento bacteriano utiliza-se de produtos bactericidas e medidas culturais (BIANCHINI, MARINGONI & CARNEIRO, 2005).

No controle de ambas as doenças, o uso de compostos químicos é priorizado e em curto prazo, tem suas vantagens, mas em longo prazo pode causar problemas devido aos resíduos acumulados nos produtos e no ambiente (GHINI & KIMATI, 2000) sendo necessário, desta forma, desenvolver métodos alternativos de controle de doenças como a indução de resistência em plantas usando produtos naturais (SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (STANGARLIN et al., 2011a). As plantas ativam um conjunto de respostas de resistência após o reconhecimento de um patógeno ou pela aplicação exógena de indutores de resistência (PASCHOLATI, 2011). Entre os indutores não convencionais podem-se incluir os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais (SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005; STANGARLIN, KUHN & SCHWAN-ESTRADA, 2008), bem como os extratos obtidos de cogumelos (DI PIERO, GARCIA & TONUCCI, 2005; VIECELLI et al., 2009).

Ainda que a diversidade dos Basidiomicotas em ecossistemas tropicais seja vasta (HAWKSWORTH, 1991), no Brasil existem poucas pesquisas relacionadas com a utilização de basidiocarpos (cogumelos e orelhas de pau) para o controle de doenças em plantas, demonstrando a escassez de estudos relacionados ao potencial dos mesmos para ativação de mecanismos de defesas em vegetais (STANGARLIN et al., 2011b). As espécies de cogumelos mais facilmente reconhecidas como os comestíveis (ISHIKAWA, KASUYA & VANETTI, 2001; PACCOLA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002) ou medicinais (SMÂNIA et al., 1995a, 1997), são alvo da maioria das investigações.

Entre os basidiomicetos com potencial para a indução de resistência, destaca-se *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr., utilizado desde a medicina popular (SMÂNIA et al., 1995b) até ao controle alternativo de doenças de planta em feijoeiro, inclusive com ação indutora de enzimas relacionadas a patogênese contra mancha angular do feijoeiro (VIECELLI et al., 2009; 2010) e o crestamento bacteriano comum (TOILLIER et al., 2010).

O fungo *P. sanguineus* conhecido popularmente como orelha-de-pau, pertence ao filo Basidiomycota e a família Polyporaceae. Esta espécie apresenta uma frutificação semicircular e de consistência lenhosa, que se forma horizontalmente contra os caules das árvores. Sua superfície é lisa e ligeiramente marcada em zonas concêntricas de coloração vermelho-laranjada (LEPP, 2008). Cresce naturalmente em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios Norte e Sul (NOBLES & FREW, 1962).

Os resultados promissores das pesquisas com *P. sanguineus* obtidos por Toillier et al. (2010) e Viecelli et al. (2009; 2010) para a cultura do feijoeiro incentivaram o desenvolvimento deste trabalho cujo objetivo é formular um extrato estável a base do basidiocarpo desse fungo para o controle da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, determinando-se a validade e a eficiência desse formulado em testes *in vitro* e *in vivo*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Obtenção e manutenção de *P. griseola*

O isolado de *P. griseola* foi obtido por isolamento direto a partir de lesões em folhas de feijoeiro naturalmente infectadas, coletadas na lavoura da Fazenda Escola da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, Paraná, e cultivado em meio de suco de tomate (200 mL de suco de tomate integral + 15 g de ágar + 4,5 g de CaCO₃ + 800 mL de água destilada), por 14 dias a temperatura de 24 °C com escotofase total (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000).

6.2.2 Obtenção e manutenção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

A bactéria *X. axonopodis* pv *phaseoli* foi obtida por isolamento indireto a partir de folhas de feijoeiro infectadas naturalmente com a doença, provenientes na lavoura da Fazenda Escola da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, Paraná. O isolamento foi realizado com fragmentos da folha (0,5 cm) na área de transição tecido sadio e tecido doente, o qual foi imerso em álcool 50% por 30 segundos, em seguida em hipoclorito de sódio (1%) por 1 min e, posteriormente, em água destilada. Após esta desinfestação superficial, foi realizada a maceração em solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada e então, com alça de platina, transferida uma alíquota do macerado para placas de Petri contendo meio ágar-nutriente, realizando-se estrias compostas. Em seguida, as placas foram identificadas, invertidas e incubadas a 25 °C, observando-se seu crescimento após 48 h (MARIANO & SILVEIRA, 2000).

A curva de crescimento bacteriano foi obtida pelo método de determinação da concentração do inóculo pela contagem em placas, descrito por Mariano & Assis (2000). Foi preparada uma suspensão da bactéria teste a partir da cultura em placas com 48 h de incubação. Foram ajustadas concentrações bacterianas para obter leituras de absorvância a 560 nm de 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,0. Cada uma das suspensões foi diluída até 10⁷, 10⁸ e 10⁹.

Foi pipetado 1 mL de cada diluição e espalhado uniformemente com alça de vidro flambada e esfriada em placas de Petri com meio ágar-nutriente, preparando-se quatro placas para cada diluição, as quais foram invertidas e incubadas a 25 °C por 48 h. Foi obtida pelo menos uma série de placas contáveis (que apresentasse entre 30 a 300 colônias) para cada absorvância. Os dados de unidades formadoras

de colônia (UFCs) foram transformados para uma mesma base de 10^{10} , obtendo-se, posteriormente, uma equação de regressão.

Para a definição da concentração da suspensão bacteriana foi efetuado o cálculo: $\text{UFC mL}^{-1} = \text{número médio de colônias} \times \text{diluição da amostra}$. Os dados de concentração (UFC) foram transformados para uma mesma base de 10^{10} , obtendo-se, posteriormente uma equação de regressão.

6.2.3 Formulação e determinação da validade do extrato de *P. sanguineus*

Os basidiocarpos de *P. sanguineus* foram coletados nas matas do município de Marechal Cândido Rondon e Cascavel e identificados de acordo com chave taxonômica para fungos (PEGLER, 1973), secados em estufa a 30°C com circulação de ar até atingir peso constante e, posteriormente, foram triturados em moinho de esfera. Para o preparo dos extratos aquosos, fez-se na hidratação do pó de basidiocarpos por 24 h a temperatura de 4°C , na proporção de 14 mL água destilada para 1 g de pó seco de basidiocarpo, sendo em seguida filtrados em papel de filtro Whatman nº 1, obtendo dessa forma o extrato bruto de basidiocarpo (ASSI, 2005; DI PIERO, WULFF & PASCHOLATI, 2006).

Em seguida, filtrou-se novamente o extrato em uma peneira de controle granulométrico de 48 mesh e o bagaço retido nessa peneira foi prensado em pano e juntado ao extrato filtrado para melhor aproveitamento do mesmo. O extrato aquoso obtido na filtração com a peneira de 48 mesh foi novamente filtrado em uma peneira de 200 mesh, sendo o bagacilho retido na peneira descartado e o extrato filtrado final foi coletado, determinado o teor de sólidos solúveis e em seguida procedida a secagem.

O teor de sólidos solúveis foi determinado pela adição de 5 gotas do extrato aquoso filtrado de *P. sanguineus* no refratômetro do tipo ABBE. Após a verificação, procedeu-se a secagem do extrato em um atomizador (Spray Dryer) de bancada que utiliza ar comprimido e energia elétrica como fonte geradora de calor. A temperatura de entrada no atomizador era de 175°C e na saída 105°C . O tempo de secagem foi de duas horas e quarenta minutos, com rendimento de 5 gramas a partir de 1.200 mL de extrato aquoso filtrado de *P. sanguineus*, com 1,0% de teor de sólidos solúveis.

O extrato seco foi coletado e rapidamente acondicionado em envelopes impermeáveis e lacrados em seladora manual. Posteriormente, parte dessas

amostras foram mantidas em temperatura ambiente e protegidas do sol para a determinação da eficiência *in vitro* e *in vivo* dos extratos sobre *P. griseola* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Outra parte das amostras foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada, mantendo-as em estufa a 40 °C por até seis meses e a cada dois meses uma amostra foi retirada da estufa e mantidas a temperatura ambiente até completar seis meses e posteriormente esse extrato seco foi diluído em água destilada nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, para realização dos testes *in vitro* e *in vivo* com os patógenos para determinação do tempo de prateleira, conforme norma da ANVISA, por meio da resolução - RE n° 398, de 12 de novembro de 2004, publicada no Diário Oficial da União de 16 de novembro de 2004, a qual determina que, se o extrato não apresentar alteração no efeito após os 6 meses, atribui-se 24 meses de validade.

6.2.4 Testes *in vitro* para determinação da validade do extrato de *P. sanguineus*

6.2.4.1 Inibição da germinação de esporos

Para *P. griseola* o teste foi realizado em lâmina de microscopia revestida por fina camada de ágar-água a 1% (1000 µL por lâmina). Alíquotas de 40 µL do extrato seco de *P. sanguineus* sob estabilidade acelerada com 0, 2, 4 e 6 meses na estufa a 40 °C, ajustadas para se obter as concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e alíquotas de 40 µL da suspensão de conídios de *P. griseola* (1x10⁴ conídios mL⁻¹) obtidos de cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida com escotofase total a 24 °C. A porcentagem de germinação foi determinada 24 h após o início do experimento com a adição de 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação dos conídios (STANGARLIN et al., 1999).

6.2.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana

Para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparado meio de cultura caldo nutriente (extrato de carne: 3 g; peptona: 5 g; glicose: 15 g; água destilada: 1.000 mL) (MARIANO & SILVEIRA, 2000). O meio de cultura (10 mL tubo⁻¹) recebeu as diferentes concentrações do extrato seco de *P. sanguineus* sob estabilidade acelerada em 0, 2, 4 e 6 meses na estufa a 40 °C, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, e, posteriormente, foram esterilizados em autoclave. Uma alíquota

de 100 µL de suspensão de células bacterianas contendo 10^{10} UFC mL⁻¹ foi adicionada a cada tubo, os quais foram incubados a 28 °C por 48 h em estufa incubadora sob agitação a 150 rpm. A avaliação do número de bactérias foi realizada por espectrofotometria, anotando-se a absorbância a 560 nm de cada amostra e calculando-se o valor de UFCs de acordo com a curva de crescimento bacteriano previamente elaborada.

6.2.5 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de *P. sanguineus*

6.2.5.1 Cultivo em casa de vegetação para determinação da validade

Os ensaios foram conduzidos em cultivo protegido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712 m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S.

Cinco plantas de feijoeiro (cultivar IAPAR 81 – Carioca) foram cultivadas em vasos plásticos, contendo 20 L de substrato com solo, areia e matéria orgânica (proporção 2:1:1). Cada tratamento foi composto por cinco vasos, os quais representavam as repetições. Não se realizou adubação devido a análise de solo apresentar resultados satisfatórios de nutrientes.

6.2.5.2 Aplicação dos extratos com estabilidade acelerada

Aplicou-se os tratamentos com os extratos secos de *P. sanguineus* submetidos a 0, 2, 4 e 6 meses na estufa a 40 °C para atribuir a estabilidade acelerada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, adicionando-se 0,25% de adjuvante natural (obtido da trituração de 100 g de linhaça hidratada com 1L de vinagre de vinho natural, e mantido a temperatura ambiente e no escuro por 20 dias), metodologia informada por Márcia Vargas Toledo – EMATER - Comunicação pessoal. Os tratamentos foram aplicados por aspersão na 3ª folha (fase vegetativa V4) em quantidade de 1 mL por folha.

6.2.5.3 Inoculação de *P. griseola* em casa de vegetação

A suspensão de conídios de *P. griseola* foi preparada em água com Tween 20 (uma gota 500 mL⁻¹) a partir de uma colônia com 14 dias de idade, sendo a concentração ajustada para 4×10^4 conídios mL⁻¹. A inoculação em casa de

vegetação foi realizada três dias após a aplicação dos extratos secos de *P. sanguineus* com estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada (fase vegetativa V4). A inoculação foi realizada no início da noite para que as plantas permanecessem no escuro para garantir a infecção e mantidas à temperatura ambiente ((STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000).

6.2.5.4 Inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em casa de vegetação

A suspensão bacteriana com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparada com solução salina (0,85% de NaCl) a partir de um isolado com 48 horas de cultivo e ajustada na concentração de 5×10^7 UFC mL⁻¹ (RAVA & SARTORATO, 1994). Foram inoculadas três dias após a aplicação dos tratamentos com extratos secos de *P. sanguineus* com estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada. A inoculação foi realizada no início da noite e as plantas mantidas à temperatura ambiente.

6.2.5.5 Avaliação da severidade para determinação da validade

A severidade da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro em casa de vegetação foi avaliada na 3ª e 4ª folhas aos 21 dias após a inoculação, por determinação da área lesionada com o auxílio do sistema computacional QUANT v. 1.0.2 (VALE, FERNANDES FILHO & LIBERATO, 2003).

6.2.6 Testes *in vitro* para determinação da eficiência do extrato de *P. sanguineus*

6.2.6.1 Inibição da germinação de esporos

Para *P. griseola* o teste foi realizado em lâmina de microscopia revestida por fina camada de ágar-água a 1% (1000 µL por lâmina). Alíquotas de 40 µL do extrato seco de *P. sanguineus* que não foi submetido a estabilidade acelerada (mantidos em temperatura ambiente), ajustadas para se obter as concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e alíquotas de 40 µL da suspensão de conídios de *P. griseola* (1×10^4 conídios mL⁻¹) obtidos de cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida com escotofase total a 24 °C. A porcentagem de germinação foi determinada 24 h após o início do experimento com a adição de 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada

lâmina, a fim de paralisar a germinação dos conídios (STANGARLIN et al., 2010). Como controles utilizaram-se água, fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e água com 0,25% de adjuvante natural.

6.2.6.2 Inibição da multiplicação bacteriana

Para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparado meio de cultura caldo nutriente (MARIANO & SILVEIRA, 2000). O meio de cultura (10 mL tubo⁻¹) recebeu as diferentes concentrações do extrato seco de *P. sanguineus* que não foi submetido a estabilidade acelerada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e, posteriormente, foram esterilizados em autoclave. Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células bacterianas contendo 10¹⁰ UFC mL⁻¹ foi adicionada a cada tubo, os quais foram incubados a 28 °C por 48 h em estufa incubadora sob agitação a 150 rpm. A avaliação do número de bactérias foi realizada por espectrofotometria, anotando-se a absorbância a 560 nm de cada amostra e calculando-se o valor de UFCs de acordo com a curva de crescimento bacteriano previamente elaborada. Como tratamentos controles utilizaram-se apenas o meio de cultura, antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e o meio de cultura com 0,25% de adjuvante natural.

6.2.7 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de *P. sanguineus*

6.2.7.1 Cultivo em casa de vegetação

Os ensaios foram conduzidos em cultivo protegido na área pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CEDETEC) da Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, com altitude de 712 m, longitude 53° 30' 01" W e latitude 24° 56' 09" S.

Cinco plantas de feijoeiro (cultivar IAPAR 81 – Carioca) foram cultivadas em vasos plásticos, contendo 20 L de substrato com solo, areia e matéria orgânica (proporção 2:1:1). Cada tratamento foi composto por cinco vasos, os quais representavam as repetições. Não se realizou adubação devido a análise de solo apresentar resultados satisfatórios de nutrientes.

6.2.7.2 Aplicação dos tratamentos em casa de vegetação

Aplicou-se os tratamentos com os extratos secos de *P. sanguineus*, não submetidos a estabilidade acelerada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, e os controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crestamento bacteriano comum. Nos extratos e no controle água foram adicionados 0,25% de adjuvante natural. Os tratamentos foram aplicados por aspersão na 3ª folha trifoliolada (fase vegetativa V4), em quantidade de 1 mL por folha.

6.2.7.3 Inoculação de *P. griseola* em casa de vegetação

A suspensão de conídios de *P. griseola* foi preparada em água com Tween 20 (uma gota 500 mL⁻¹) a partir de uma colônia com 14 dias de idade, sendo a concentração ajustada para 4x10⁴ conídios mL⁻¹. A inoculação em casa de vegetação foi realizada três dias após a aplicação dos extratos secos de *P. sanguineus* não submetidos a estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada (fase vegetativa V4). A inoculação foi realizada no início da noite para que as plantas permanecessem no escuro para garantir a infecção e mantidas à temperatura ambiente (STANGARLIN, PASCHOLATI & LABATE, 2000).

6.2.7.4 Inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em casa de vegetação

A suspensão bacteriana com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi preparada com solução salina (0,85% de NaCl) a partir de um isolado com 48 horas de cultivo e ajustada na concentração de 5 x 10⁷ UFC mL⁻¹ (RAVA & SARTORATO, 1994). Foram inoculadas três dias após a aplicação dos tratamentos com extratos secos de *P. sanguineus* não submetidos a estabilidade acelerada, na 3ª folha trifoliolada tratada, bem como na 4ª folha trifoliolada não tratada. A inoculação foi realizada no início da noite e as plantas mantidas à temperatura ambiente.

6.2.7.5 Avaliação da severidade para determinação da eficiência

A severidade da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro em casa de vegetação foi avaliada na 3ª e 4ª folhas aos 21 dias após a

inoculação, por determinação da área lesionada com o auxílio do sistema computacional QUANT v. 1.0.2 (VALE, FERNANDES FILHO & LIBERATO, 2003).

6.2.8 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro em casa de vegetação

6.2.8.1 Avaliação de crescimento de parte aérea e raiz

Para o teste de avaliação do desenvolvimento de plantas de feijoeiro, aplicou-se os extratos secos de *P. sanguineus* nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e os controles água, fungicida sistêmico azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) aos 20 dias após o plantio. Aos 50 dias coletaram-se as plantas, separando parte aérea da raiz para pesagem do material a fresco, sendo posteriormente seco em estufa a 104 °C por 24 horas para avaliação da massa seca. Para este teste não inoculou-se patógeno.

6.2.9 Análise estatística

6.2.9.1 Análise estatística dos testes para determinação da validade

O delineamento experimental *in vitro* e em casa de vegetação foi organizado em esquema fatorial 4x4 (quatro tempos de estabilidade acelerada a 40 °C do extrato seco de *P. sanguineus* (0; 2; 4 e 6 meses) nas concentrações (50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹). *In vitro* foram três repetições e a casa de vegetação foram cinco repetições.

Os dados foram expressos em porcentagem e transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. As análises de variância (ANAVA) foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). A comparação das médias dos tratamentos foi realizada com a aplicação do teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

6.2.9.2 Análise estatística dos testes para determinação da eficiência

Para avaliação do efeito dos extratos secos de *P. sanguineus*, não submetidos a estabilidade acelerada, o delineamento experimental *in vitro* foi inteiramente casualizado, com 7 tratamentos, sendo o extrato nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e os controles água, adjuvante natural e fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para a germinação de esporos de *P. griseola* e

antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para multiplicação bacteriana de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, com três repetições cada.

Em casa de vegetação o delineamento inteiramente casualizado apresentava as concentrações do extrato de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e os controles água e fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) para o ensaio com mancha angular e antibiótico sistêmico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) para crestamento bacteriano comum, e ambos para a variável de crescimento, com cinco repetições cada tratamento.

Os dados expressos em porcentagem foram transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. As análises de variância (ANAVA) foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). A comparação das médias dos tratamentos foi realizada com a aplicação do teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Formulação e determinação da validade do extrato de *P. sanguineus*

6.3.2 Testes *in vitro* para determinação da validade do extrato de *P. sanguineus*

6.3.2.1 Inibição da germinação de esporos

A análise de variância do efeito do extrato seco de *P. sanguineus*, mantido em estufa a 40 °C por 0, 2, 4 e 6 meses, não foi significativo para a germinação de esporos de *P. griseola*, podendo-se atribuir para tanto a validade de 24 meses (Tabela 6.1).

Tabela 6.1: Germinação de esporos de *P. griseola* em função dos tratamentos com extratos secos de *P. sanguineus* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.

Tempo (meses)	Germinação de esporos (%)				Média
	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	
0 ^{ns}	76,6	64,0	72,0	72,4	71,2
2 ^{ns}	71,3	70,6	61,3	59,3	65,6
4 ^{ns}	80,0	77,0	79,3	73,6	77,4
6 ^{ns}	72,6	71,3	70,0	67,3	70,3
Média	75,1	70,7	70,6	68,1	70,9
C. V. (%) = 8,86					

Tratamento seguido de ns indica não significância estatística. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$.

6.3.2.2 Inibição da multiplicação bacteriana

A análise de variância do efeito do extrato seco de *P. sanguineus*, mantido em estufa a 40 °C por 0, 2, 4 e 6 meses, e testado nas concentrações de 50; 100; 150 e 200 mg L⁻¹ sobre a multiplicação bacteriana de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, mostrou-se significativa apenas para a maior concentração, pelo período de 4 meses (Tabela 6.2). As demais concentrações mantiveram estabilidade por 6 meses na estufa, atribuindo portanto, 24 meses de validade para a atividade *in vitro* sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Tabela 6.2: Multiplicação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em função dos tratamentos com extratos secos de *P. sanguineus* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.

Tempo (meses)	Concentração bacteriana (UFC mL ⁻¹ x10 ¹⁰)				Média
	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ⁻¹	
0 ^{ns}	4,5	1,0	3,1	0,9 a	2,4
2	6,1 B	1,8 A	2,0 A	7,3 Bc	4,3
4	5,6 B	1,2 A	1,3 A	1,0 Aa	2,3
6 ^{ns}	3,9	2,9	1,8	4,9 bc	3,4
Média	5,0	1,7	2,1	3,5 A	3,12
C. V. (%) = 58,1					

Média seguida de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, difere pelo teste de Tukey a 5%. Tratamento seguido de ns indica não significância estatística.

6.3.3 Testes em casa de vegetação para determinação da validade do extrato de *P. sanguineus*

6.3.3.1 Avaliação da severidade de *P. griseola* para determinação da validade

Em casa de vegetação, a severidade da mancha angular na 3ª folha tratada com o extrato de *P. sanguineus* sob estabilidade acelerada mostrou-se estável durante os 6 meses para as concentrações de 50; 100 e 200 mg L⁻¹. A concentração de 150 mg L⁻¹ aumentou a severidade a partir dos 4 meses na estufa (Tabela 6.3). Dessa forma, não se recomenda utilizar a concentração de 150 mg L⁻¹, por apresentar menor tempo de validade (12 meses) e sim as concentrações de 50; 100 e 200 mg L⁻¹ que apresentam validade de 24 meses.

Para a 4ª folha, apenas inoculada, não houve diferença na severidade para os extratos, de acordo com a análise de variância (Tabela 6.3). Sugere-se que o efeito sistêmico persiste nos extratos com validade de 24 meses, inclusive para a concentração de 150 mg L⁻¹ que não tem a mesma validade para efeito local. A literatura não relata testes de estabilidade acelerada de extratos de *P. sanguineus*, porém Silva et al. (2009) relatam que o extrato metanólico:aquoso do cogumelo *Agaricus blazei*, com 6 horas de extração, apresentou alta atividade antioxidante quando aplicado em óleo de soja, maior que o antioxidante sintético (BHT 100 mg kg⁻¹), considerando um potencial antioxidante natural.

Tabela 6.3: Severidade da mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *P. sanguineus* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.

Tempo (meses)	Severidade (%) 3ª Folha				
	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ⁻¹	200 mg L ^{-1ns}	Média
0 ^{ns}	1,9	2,8	2,6 a	2,1	2,3
2	0,9 A	3,4 B	1,4 Aba	1,9 AB	1,9
4	2,6 AB	2,0 AB	4,1 Bb	0,9 A	2,4
6	2,4 AB	2,1 AB	4,5 Bb	1,0 A	2,5
Média	1,9	2,5	3,1	1,4	2,32
C. V. (%) = 49,77					
Tempo (meses)	Severidade (%) 4ª Folha				
	50 mg L ^{-1ns}	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ^{-1ns}	200 mg L ^{-1ns}	Média
0 ^{ns}	0,6	0,3	0,2	0,2	0,3
2 ^{ns}	0,4	0,4	0,3	0,1	0,3
4 ^{ns}	0,5	0,2	0,2	0,1	0,2
6 ^{ns}	0,4	0,2	0,4	0,3	0,3
Média	0,4	0,2	0,2	0,1	0,27
C. V. (%) = 50,74					

Média seguida de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, difere pelo teste de Tukey a 5%. Tratamento seguido de ns indica não significância estatística. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$. Ensaio realizado em casa de vegetação. Tratamentos aplicados na 3ª folha três dias antes da inoculação com *P. griseola*, que ocorreu na 3ª e 4ª folha.

6.3.3.2 Avaliação da severidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* para determinação da validade

Para o crestamento bacteriano comum em casa de vegetação, a severidade na 3ª folha mostrou-se estável até o segundo mês de armazenamento, para as concentrações de 50 e 150 mg L⁻¹, atribuindo assim, para essas concentrações a validade de 12 meses, ao passo que para 100 e 200 mg L⁻¹ a validade atinge 24 meses (Tabela 6.4).

Na 4ª folha, apenas inoculada com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, a sistemicidade do efeito do extrato de *P. sanguineus* permanece até o segundo mês para as concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹, sendo que as concentrações de 150 e 200 mg L⁻¹ se mantiveram estáveis por todo o período (Tabela 6.4). Dessa forma, a validade da ação sistêmica do extrato seco de *P. sanguineus* para as concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹ é de 12 meses e para as maiores concentrações, de 150 e 200 mg L⁻¹, é de 24 meses.

Tabela 6.4: Severidade do crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *P. sanguineus* submetidos ao processo de estabilidade acelerada.

Severidade (%) 3ª Folha					
Tempo (meses)	50 mg L ⁻¹	100 mg L ^{-1ns}	150 mg L ⁻¹	200 mg L ^{-1ns}	Média
0	10,8 Ba	9,5 B	3,7 Aa	13,3 B	9,3
2 ^{ns}	12,2 a	9,5	8,8 a	14,0	11,1
4	21,8 Bb	10,1 A	18,4 Bb	18,3 B	17,1
6	21,4 Bb	13,5 A	19,3 ABb	16,2 AB	17,6
Média	16,5	10,6	12,5	15,4	13,76
C. V. (%) = 26,02					
Severidade (%) 4ª Folha					
Tempo (meses)	50 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	150 mg L ^{-1 ns}	200 mg L ^{-1ns}	Média
0 ^{ns}	0,9 a	2,7 a	2,3	2,0	1,9
2 ^{ns}	1,6 a	2,5 a	2,7	2,3	2,2
4	8,2 Cb	5,5 Bb	1,9 A	2,2 A	4,4
6	7,9 Cb	4,4 Bb	2,7 A	2,8 A	4,4
Média	4,6	3,7	2,4	2,3	3,30
C. V. (%) = 29,0					

Média seguida de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, difere pelo teste de Tukey a 5%. Tratamento seguido de ns indica não significância estatística. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x}/100$. Ensaio realizado em casa de vegetação. Tratamentos aplicados na 3ª folha três dias antes da inoculação com *P. griseola*, que ocorreu na 3ª e 4ª folha.

Com base nesses dados, atribui-se para mancha angular do feijoeiro nos testes *in vitro* e *in vivo*, a determinação da validade de 24 meses do extrato seco de *P. sanguineus* na menor concentração (50 mg L⁻¹). Para o crestamento bacteriano comum, essa mesma concentração do extrato se restringe a 12 meses, contudo, a concentração de 200 mg L⁻¹ manteve efeito local e sistêmico com estabilidade atribuída por 24 meses.

6.3.4 Testes *in vitro* para determinação da eficiência do extrato de *P. sanguineus*

6.3.4.1 Inibição da germinação de esporos

A análise de variância das concentrações do extrato aquoso seco de *P. sanguineus* sobre a germinação de esporos de *P. griseola* mostra-se significativa e indica que a concentração de 100 mg L⁻¹ desse extrato apresentou fungitoxidade, com inibição de 24,5% em comparação com a testemunha água (0) e não diferindo do fungicida. Os demais tratamentos não diferenciaram da água, inclusive o adjuvante natural, podendo utilizá-lo nos testes *in vivo* (Figura 6.1).

A atividade antimicrobiana de basidiocarpos da família Polyporaceae é conhecida desde 1946, quando Bose (1946) isolou 'poliporin' de *Polystictus sanguineus* um composto ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e sem toxicidade aos animais.

Viecelli et al. (2009; 2010), estudando o efeito da aplicação de extratos aquosos obtidos por maceração estática de *Pycnoporus sanguineus* contra *P. griseola* em feijoeiro, concluíram que os extratos controlam a mancha angular através de atividade antimicrobiana sobre o patógeno com redução de até 70% na germinação dos esporos, e indução de resistência envolvendo atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, de forma localizada e sistêmica.

Para Baldo (2008), extratos aquosos de basidiocarpo de *P. sanguineus* inibiram a germinação *in vitro* de esporos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e de *Phakopsora euvitis* em até 97; 79 e 73%, respectivamente, em relação à testemunha água. Semelhantemente, Assi (2005) relata redução em até 96% na germinação *in vitro* de esporos de *C. lindemuthianum*.

Os efeitos antifúngicos e antimicrobianos de *P. sanguineus* também são relatados por Pérez-Silva et al. (1988), o qual ressalta a utilização do basidiocarpo na medicina popular por tribos indígenas das Américas e da África para tratamento

de diversas enfermidades. Essas características são atribuídas a gama de compostos químicos presente na família Polyporaceae (WASSER, 2002).

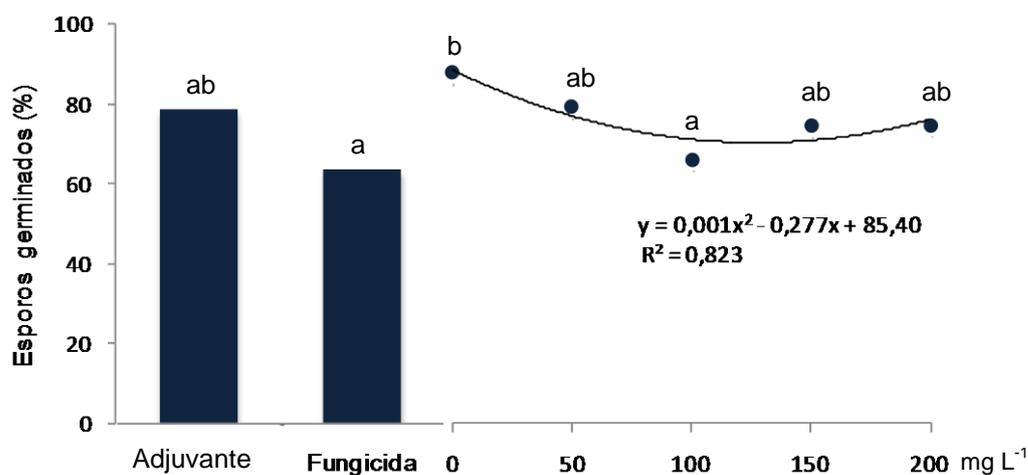


Figura 6.1: Percentual de germinação de esporos de *P. griseola* em função do tratamento com extratos secos de *P. sanguineus* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), fungicida azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$.

6.3.4.2 Inibição da multiplicação bacteriana

Para o crestamento bacteriano comum, todas as concentrações do extrato seco de *P. sanguineus* inibiram significativamente em 100% a multiplicação bacteriana, quando comparado a testemunha água, não diferindo do antibiótico. Da mesma forma que para mancha angular, o adjuvante não diferiu da testemunha, podendo-se utilizá-lo com o extrato aquoso no momento da aplicação nas plantas (Figura 6.2).

Resultados semelhantes de atividade antibacteriana por *P. sanguineus* são relatados em trabalhos de Smânia, Smânia Jr. & Leite (1998), os quais realizaram estudos com o extrato etanólico do basidiocarpo, observando a síntese de metabólitos secundários e a atividade antimicrobiana contra bactérias de produtos alimentícios. Em suas conclusões, observaram que o Basidiomiceto produziu cinabarina, um antibiótico de coloração alaranjada (produzido entre o 18^o e o 22^o dia de crescimento do fungo) (SMÂNIA et al., 1995b).

Da mesma forma, Toillier et al. (2010) verificou as atividades antibacteriana e indutora de resistência de extratos de *P. sanguineus* para controle do crestamento

bacteriano comum em feijoeiro, utilizando extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura deste fungo. Foi observada atividade antibacteriana contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* apenas para o filtrado de cultura em concentrações acima de 15% e para o extrato de basidiocarpo em todas as concentrações avaliadas.

Os trabalhos citados mostram-se promissores com extratos de basidiocarpos no controle de fitopatógenos, em testes realizados *in vitro*. Poucos são os trabalhos, mesmo com resultados em potencial, que foram estendidos a casa de vegetação e/ou campo, transparecendo a necessidade de continuação e conclusão das pesquisas para a elaboração de formulados e informações como concentração do extrato, quantidade de calda, números de aplicações e época de aplicação para ser repassado aos agricultores e, de fato, concretizar o objetivo das pesquisas que visam o controle alternativo de doenças em plantas.

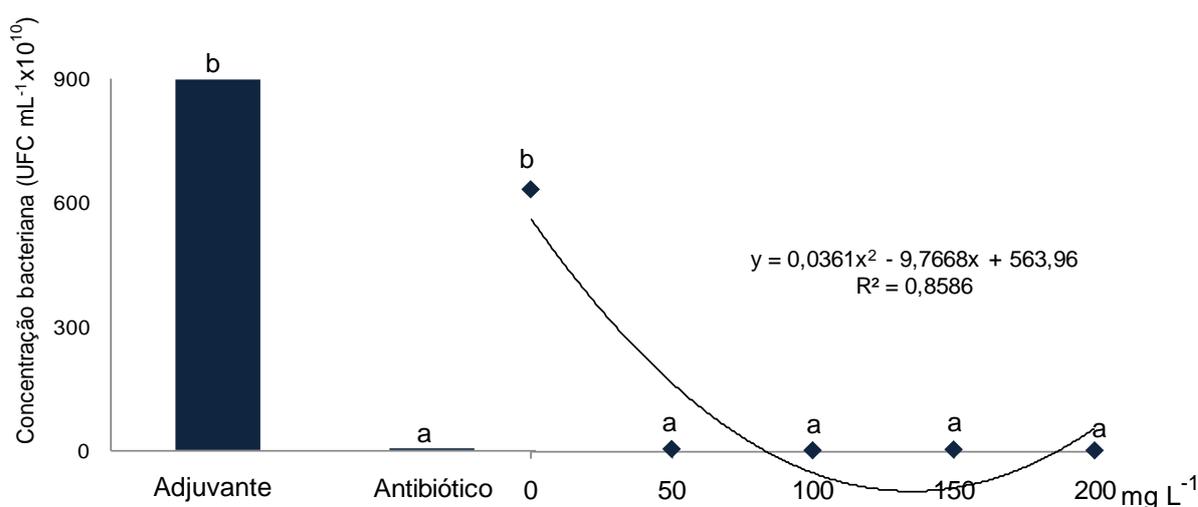


Figura 6.2: Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em função do tratamento com extratos secos de *P. sanguineus* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, testemunha água (0), antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina) e adjuvante natural. Média seguida de letra distinta difere pelo teste de Tukey a 5%.

6.3.5 Testes em casa de vegetação para determinação da eficiência do extrato de *P. sanguineus*

6.3.5.1 Avaliação da severidade para determinação da eficiência

A severidade da mancha angular do feijoeiro na 3ª folha tratada e inoculada foi reduzida apenas no tratamento com fungicida. Os extratos secos de *P. sanguineus* não diferiram do controle água. Na 4ª folha, apenas inoculada, as concentrações de 100; 150 e 200 mg L⁻¹ tenderam a reduzir a severidade sendo estatisticamente igual ao fungicida, porém também não diferenciaram do controle (Tabela 6.5).

Em trabalhos desenvolvidos por Assi (2005), os extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* reduziram a severidade da antracnose (*C. lindemuthianum*) em feijoeiro de forma sistêmica. Essa capacidade de generalização do efeito na planta com extratos do basidiocarpo também é relatada por Baldo (2008), a qual verificou incremento na atividade específica de β-1,3 glucanase em feijoeiro tratado com extrato de *P. sanguineus* e desafiado com *C. lindemuthianum*. Na 1ª folha, tratada e inoculada, houve incremento de 28% na atividade, enquanto que na 2ª folha, não tratada, mas inoculada, o filtrado de cultura a 5% e o extrato de micélio a 10% incrementaram em 331 e 1057%, respectivamente, a atividade dessa enzimas chaves para a resistência das plantas de feijoeiro aos patossistemas.

Tabela 6.5: Severidade e percentual de controle da mancha angular causada por *P. griseola* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *P. sanguineus* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas.

Tratamentos	Severidade (%)			
	3ª Folha	Controle (%)	4ª Folha	Controle (%)
0	3,3 b	-	0,5 b	-
50 mg L ⁻¹	1,9 b	42,5	0,6 b	-20,0
100 mg L ⁻¹	2,8 b	15,2	0,4 ab	20,0
150 mg L ⁻¹	2,6 b	21,3	0,3 ab	40,0
200 mg L ⁻¹	2,1 b	36,4	0,3 ab	40,0
Fungicida	0,2 a	94,0	0,03 a	94,0
Regressão	y = 2E-05x ² - 0,007x + 3,039		y = 9E-07x ² - 0,001x + 0,584	
R ²	0,303		0,790	

Médias seguidas de letra distinta diferem pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$. Fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹).

Da mesma forma, Baldo et al (2011) observaram no experimento *in vitro* com filtrados de cultura de *P. sanguineus*, ausência de efeito inibitório sobre o crescimento micelial, a esporulação e a germinação de conídios de *P. griseola*. A área abaixo da curva de progresso da mancha angular foi reduzida em 82 e 49%

respectivamente, nas plantas cultivadas em casa de vegetação e no campo em relação ao controle água. A atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase e os teores de proteínas e clorofilas foram maiores nas plantas tratadas com o extrato.

Outros basidiocarpos são relatados com potencial no controle alternativo de doenças, como *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*, que reduziram a severidade da antracnose em folhas de pepino pré-tratadas com os extratos dos basidiocarpos. O efeito protetor foi dependente da concentração do extrato utilizado e, em menor grau, do intervalo de tempo entre a indução e a inoculação (DI PIERO & PASCHOLATI, 2004).

Para o crestamento bacteriano comum do feijoeiro não houve redução na severidade da 3ª folha quando tratada com extratos aquosos de *P. sanguineus*. As concentrações que se mostraram promissoras foram as de 100 e 150 mg L⁻¹ que não diferenciam do antibiótico, porém também foram iguais ao controle. Para a 4ª folha apenas inoculada, o efeito sistêmico foi confirmado e todos os extratos reduziram a severidade sem diferenciar do antibiótico, atingindo níveis de controle de até 86,8% na concentração de 50 mg L⁻¹ (Tabela 6.6).

O potencial de extratos de basidiocarpos para o controle do crestamento bacteriano comum em feijoeiro é comentado por Toillier et al. (2010), ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto por indução de resistência envolvendo a ativação das enzimas de defesa vegetal peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase. O potencial de *P. sanguineus* para a ativação de mecanismos de defesa em plantas contra doenças também é relatado por Beninca et al. (2008), que avaliou o efeito de extratos orgânicos de basidiocarpos e verificou que o extrato diclorometanólico para sorgo e soja e etanólico para soja, inibem a atividade de peroxidase, enquanto que o extrato hexânico promove a atividade dessa enzima para sorgo e a atividade específica para soja.

Para Viecelli et al. (2010), o efeito das concentrações do extrato de micélio de *P. sanguineus* sobre a germinação, crescimento micelial e esporulação de *P. griseola* foi significativa apenas para o extrato esterilizado por filtração, não apresentando diferença estatística para o extrato autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Esses dados podem respaldar a ineficiência do extrato seco testado nesse trabalho, uma vez que a temperatura da secagem foi superior ao citado e, provavelmente, inativou ou degradou compostos químicos do extrato.

Para trabalhos posteriores, indica-se alterar temperatura de secagem na formulação do extrato para verificar a influência desse método na eficiência do mesmo. Sugere-se ainda testes em diferentes patossistemas visando o controle de doenças em plantas.

Tabela 6.6: Severidade e percentual de controle do crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. IAPAR 81 tratado com extratos secos de *P. sanguineus* na terceira folha, três dias antes da inoculação realizada na terceira e quarta folhas.

Tratamentos	Severidade (%)			
	3ª Folha	Controle (%)	4ª Folha	Controle (%)
0	14,5 b	-	6,8 b	-
50 mg L ⁻¹	10,8 b	25,6	0,9 a	86,8
100 mg L ⁻¹	9,5 ab	34,5	2,7 a	60,3
150 mg L ⁻¹	8,7 ab	40,0	2,3 a	66,2
200 mg L ⁻¹	13,3 b	8,3	2,0 a	70,6
Antibiótico	2,7 a	81,4	1,7 a	75,0
Regressão	$y = 0,000x^2 - 0,106x + 14,73$		$y = 0,000x^2 - 0,068x + 5,928$	
R ²	0,934		0,611	

Médias seguidas de letra distinta diferem pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados por arco seno $\sqrt{x/100}$. Antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina)

6.3.6 Avaliação de variáveis de crescimento do feijoeiro

6.3.6.1 Avaliação de crescimento de parte aérea

A análise de variância do efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento de plantas de feijoeiro em casa de vegetação mostrou-se significativa, com tendência de aumento do crescimento da parte aérea, analisada em massa fresca, na ordem de 81,4; 139,8; 215 e 76,1% para as concentrações de 50; 100; 150 e 200 mg L⁻¹ do extrato de *P. sanguineus*, respectivamente. O fungicida e o antibiótico não diferiram do controle. Ao analisar a massa seca da parte aérea verifica-se incremento em 182,3% para a concentrações de 150 mg L⁻¹ do extrato seco, diferindo do controle (Figura 6.3).

Na literatura não há trabalhos que relatam o efeito de *P. sanguineus* sobre o desenvolvimento de plantas, porém compreende-se que a produção de compostos químicos do basidiocarpo como xilanase e β -glucosidase (ESPOSITO et al. 1993), cinabarina (SMÂNIA et al., 1995a), α -amilase (SIQUEIRA, MIZUTA & GIGLIO, 1997), lacase (POINTING, JONES & VRIJMOED, 2000) e tirosinase (HALAOULI et

al., 2005) podem estar envolvidas em processos fisiológicos e estimular o desenvolvimento vegetativo. O incremento do teor de clorofila, pigmento envolvido diretamente com a produção de energia da planta, foi verificado em feijoeiro tratado com filtrado de cultura (VIECELLI et al., 2009) e micélio de *P. sanguineus* (VIECELLI et al., 2010), podendo este processo favorecer o aumento do desenvolvimento vegetal por suprir um provável custo energético da indução de resistência.

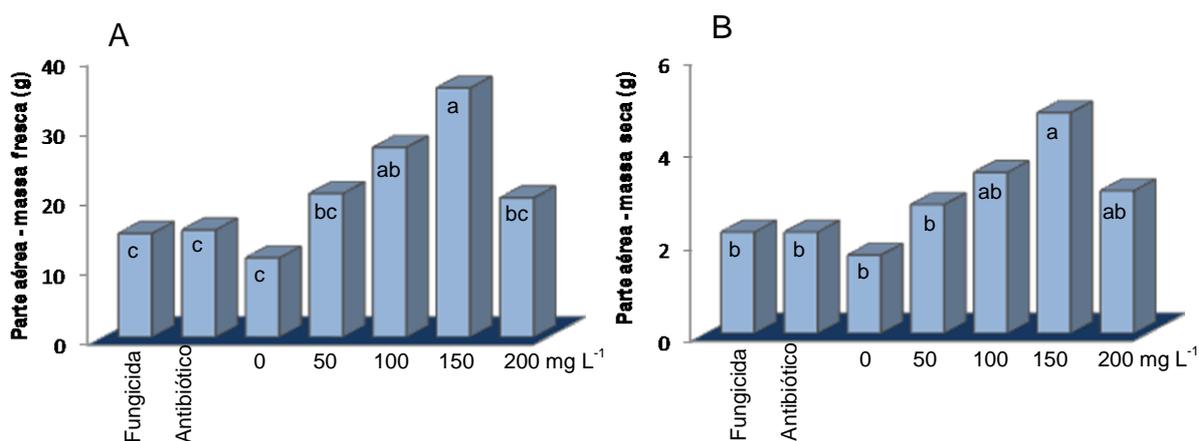


Figura 6.3: Massas fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *P. sanguineus* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos, em condições de casa de vegetação. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

6.3.6.2 Avaliação de crescimento de raiz

A massa fresca do sistema radicular foi estimulada em 136,3 e 145,4% nas concentrações de 150 e 200 mg L⁻¹ respectivamente, diferindo do controle. Porém a massa seca da raiz, apesar de apresentar tendência de crescimento quando tratada com os extratos de *P. sanguineus*, não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, conforme figura 6.4.

O sistema radicular apresenta importante função para a planta, pois é responsável pela fixação no solo e absorção de elementos minerais e água (RAVEN, EVERT & EICHHORN, 2010), dessa forma, o aumento do desenvolvimento da raiz nas plantas tratadas com os extratos de *P. sanguineus* respaldam, de forma mais eficiente, o crescimento vegetativo. Observou-se neste trabalho que a maximização

do crescimento radicular está associada ao aumento da parte aérea, uma vez que esta supre a energia e os hormônios necessários para a raiz (SCHOOLEY,1996).

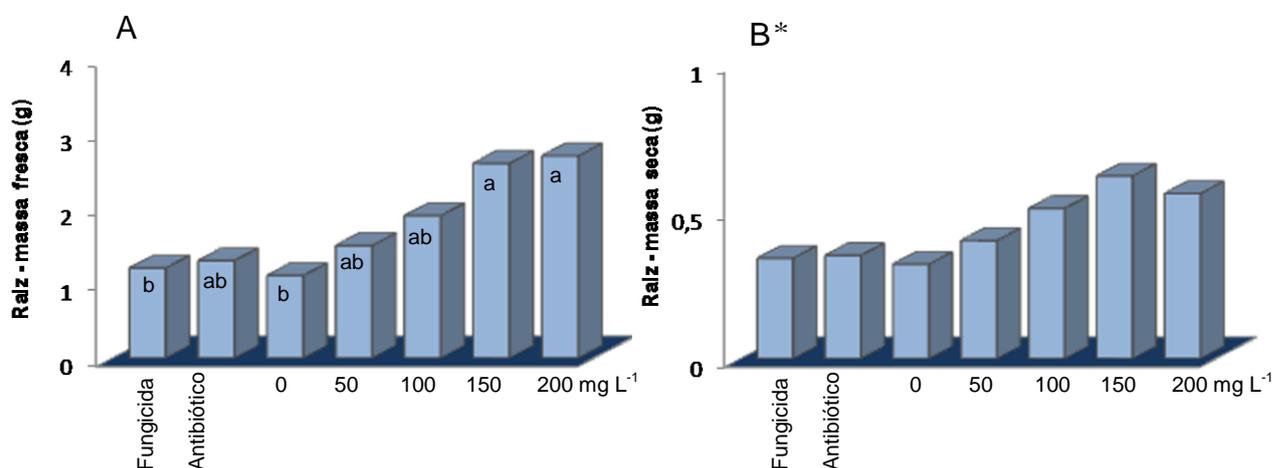


Figura 6.4: Massas fresca (A) e seca (B) da raiz de plantas de feijoeiro cv. IAPAR 81 tratadas com extratos secos de *P. sanguineus* nas concentrações 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ e comparadas com plantas tratadas apenas com água destilada (0), fungicida: azoxystrobin (40 mg i.a. L⁻¹) e antibiótico (22,5 mg L⁻¹ de oxitetraciclina + 225 mg L⁻¹ de estreptomicina), aos 50 dias após a emergência e 25 dias após a aplicação dos tratamentos, em condições de casa de vegetação. Variável seguida de asterisco (*) indica não significância estatística. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Na literatura não há trabalhos que avaliaram o efeito de extratos de basidiocarpos sobre o desenvolvimento de plantas, apenas resultados com fungos fitopatogênicos, como os descritos por Spiassi (2011), a qual observou que o filtrado de cultura do fungo *Macrophomina phaseolina* nas concentrações 5 e 15%, apresentou menor massa fresca de parte aérea de *Euphorbia heterophylla* (leiteiro ou amendoim-bravo) e, na concentração de 15%, *Diplodia maydis* apresentou menor massa seca de raiz e parte aérea. Já o filtrado de *Fusarium graminearum* não apresentou diferença significativa para o parâmetro massa fresca de raiz e parte aérea, mas teve menor massa seca de raiz em todas as concentrações. Quando testados sobre *Bidens pilosa* (picão-preto), o filtrado de *F. graminearum* diminuiu a massa fresca e seca e o filtrado de *Fusarium solani* reduziu apenas a massa fresca. Sobre plantas de soja, os filtrados de cultura de *M. phaseolina* e *D. maydis* diminuiriam significativamente a massa fresca de raiz das plântulas e em milho houve redução de matéria fresca de raiz quando se utilizou o filtrado de *F.*

graminearum, *F. solani* na concentração 20% e *M. phaseolina* e *D. maydis* em todas as concentrações testadas.

Relatos de Souza Filho e Duarte (2007) utilizando filtrado de cultura do fungo *F. solani* na concentração de 4%, observam efeito inibitório sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo de malícia (*Mimosa pudica* L.) e mata-pasto (*Senna obtusifolia* L.).

6.4 CONCLUSÃO

O extrato formulado a partir de *P. sanguineus* apresenta, para mancha angular, nos testes *in vitro* e *in vivo*, validade de 24 meses na concentração de 50 mg L⁻¹ e para o crestamento bacteriano comum, essa mesma concentração do extrato se restringe a 12 meses, contudo a concentração de 200 mg L⁻¹ manteve estabilidade de 24 meses.

A atividade antimicrobiana indica redução na germinação dos esporos de *P. griseola* e na multiplicação bacteriana. Em casa de vegetação, os extratos estimularam o desenvolvimento da parte aérea e radicular de plantas de feijoeiro, mas a severidade da mancha angular não foi reduzida. Para o crestamento bacteriano comum, os extratos apresentaram ação sistêmica para o controle dessa doença, em todas as concentrações. Estes resultados indicam o potencial do extrato seco de *P. sanguineus* para o controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSI, L. Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib, na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L. ex. Fr.). Dissertação Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 51 p. 2005.

BALDO, M. Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus*. Marechal Cândido Rondon. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 72p. 2008.

BALDO, M.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Detecção *in situ* de espécies reativas de oxigênio em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnoporus sanguineus* e inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.4, p.174-179, 2011.

BENNINCA, C.P.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; ECKSTEIN, B.; COSTA, V.C.; NOGUEIRA, M.A.; STANGARLIN, J.R.; SCHWANESTRADA, K.R.F. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.3, p.285-292, 2008.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J. A.M. (Eds). **Manual de Fitopatologia**. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. 3ª ed. Editora Ceres, São Paulo – SP. p.333-349, 2005.

BOSE, S.R. Antibiotics in a Polyporus (*Polystictus sanguineus*). **Nature**, v.158, p.292-296, 1946.

DI PIERO, M. R.; PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.243-250, 2004.

DI PIERO, R.M.; GARCIA JR.,D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.29-50, 2005.

DI PIERO R.M.; WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.2, p.169-174, 2006.

ESPOSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L.H.; FERRAZ, A.; CANHOS, V.P.; DURAN, N. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): applications. **Journal of Biotechnology**, v.29, n.3, p.219–228, 1993.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 66p. 2000.

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

HALAOULI, S.; ASTHER, M.; KRUUS, K.; GUO, L.; HAMDI, M.; SIGOILLT, J.C.; ASTHER, M.; LOMASCOLO, A. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.2, p.332–343, 2005.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v.95, n.6, p.641-655, 1991.

ISHIKAWA, N.K.; KASUYA, M.C.M.; VANETTI, M.D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.3, p.206-210, 2001.

LEPP, H. **Cosmopolitan and pan-tropical species**. Australian National Botanic Gardens, Fungi Web Site. <http://www.anbg.gov.au/fungi/mycogeography-cos-pan.html>. 2008. Acesso em 17/12/2011.

MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p.49-52, 2000.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. Isolamento de bactérias fitopatogênicas. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p.27-35, 2000.

NOBLES, M.K.; FREW, B.P. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. The genus *Pycnoporus* Karst. **Canadian Journal of Botany**, v.40, p.987-1016, 1962.

OLIVEIRA, J.M.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; MANTOVANI, M.S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*, **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p.1775–1780, 2002.

PACCOLA, A.S.; MAKI, C.S.; NÓBREGA, G.M.A.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Antagonistic effect of edible mushrooms extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal Microbiology**, v.32, n.3, p.176-178, 2001.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In.: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. Volume 1: princípios e conceitos. 4.ed., Piracicaba: Agronômica Ceres, p.593-633, 2011.

PEGLER, D.N. Poroid Families of the Aphylophorales. In: AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A. **The fungi an advanced treatise**. Academic Press: New York, p.402-409, 1973.

PÉREZ-SILVA, E.; AGUIRRE-ACOSTA, E.; PÉREZ-AMADOR, Y.C. Aspectos sobre el uso y la distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) en México. **Revista Mexicana de Microbiología**, v.4, p.137-144, 1988.

POINTING, S.B.; JONES, E.B.G.; VRIJMOED, L.L.P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, v.29, n.1, p.139–144, 2000.

RAVA, C.A, SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Embrapa: Brasília, p.217-242. 1994.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 830p., 2010.

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.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.125-138, 2005.

SCHOOLEY, J. **Introduction to botany**. Delmar Publishers, United State: ITP, 406p. 1996.

SILVA, A.C.; OLIVEIRA, M.C.; DEL RE, P.V.; JORGE, N. Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. **Ciência e agrotecnologia**. v.33, n.4, p.1103-1108. 2009.

SIQUEIRA, E.M.A.; MIZUTA, K.; GIGLIO, J.R. *Pycnoporus sanguineus*: a novel source of α -amylase. **Mycological Research**, v.101, n.2, p.188–190, 1997.

SMÂNIA, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, n.3, p.177-181, 1995a.

SMÂNIA, A.; SMÂNIA E.F.A.; CRUZ, F.S.; BENCHETRIT, L.C. Growth and production phases of *Pycnoporus sanguineus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.26, n.3, p.236-238, 1995b.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GIL, M.L. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.70, n.1, p.57-59, 1997.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA Jr, A.; LEITE, C.L. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.4, p.317-320, 1998.

SOUZA FILHO, A. P. S.; DUARTE, M. L. R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, Viçosa, v.25, n.1, p.227-230, 2007.

SPIASSI, A. Alelopatia de fungos fitopatogênicos sobre plantas invasoras. Dissertação de mestrado da Unioeste – Universidade Estadual do Paraná, campus Cascavel. 59p. 2011.

STANGARLIN, J.R.; SCWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.11, p.16-21, 1999.

STANGARLIN, J.R, PASCHOLATI, S.F, LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.1, p.59-66, 2000.

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.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.S. Estratégias de seleção e uso de extratos de plantas no controle microbiano *in vitro*. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 1ª ed. Brasília/DF: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, p.293-345, 2010.

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, 2011a.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. 1ª ed. Badajoz-Espanha: Formatex Research Center, v.2, p.1033-1042, 2011b.

TOILLIER, S.; VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; IURKIV, L. KUHN, O.J.; 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.

VALE, F.X.R; FERNANDES FILHO, E.I; LIBERATO, J.R. QUANT – A software for plant disease severity assessment. **8th International Congress of Plant Pathology**, 105p. 2003.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnopus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.2, p.81-90, 2009.

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.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.60, n.3, p.258-274, 2002.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Perante os resultados do presente trabalho, conclui-se que o extrato seco de alecrim apresenta validade de 24 meses, ao passo que para os extratos de cúrcuma e *P. sanguineus* a validade é de 24 meses para o controle da mancha angular e 18 e 12 meses para o controle do crestamento bacteriano comum, respectivamente.

Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana por inibir a germinação de esporos de *P. griseola* e a multiplicação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, exceto para alecrim sobre *P. griseola*.

Todos os tratamentos tenderam a incrementar massa fresca e seca da parte aérea e raiz do feijoeiro, efeito importante para garantir boa fixação e absorção de água e sais minerais, assim como realizar fotossíntese na parte aérea e maximizar a produtividade.

Em casa de vegetação, a severidade não foi reduzida de forma significativa para os extratos secos de *P. sanguineus*, a passo que os extratos secos de alecrim na concentração de 150 mg L⁻¹ e de cúrcuma a 50 mg L⁻¹ foram eficientes, reduzindo a severidade semelhantemente ao controle químico e superior a testemunha.

A campo, essas concentrações dos extratos secos de alecrim e cúrcuma diluídos em água e acrescentado o adjuvante natural, foram eficientes na redução da AACPD de forma significativa e incrementaram a produtividade quando realizado uma aplicação com o extrato seco de alecrim aos 14 dias do plantio, em plantas desafiadas com mancha angular, e três aplicações para o crestamento bacteriano comum. Para o extrato de cúrcuma, o melhor resultado foi obtido com três aplicações para ambas as doenças. Estes tratamentos recomendados foram superiores a testemunha e semelhante ao controle químico.

Ressalta-se ainda que esta pesquisa desenvolvida está inserida no objetivo do grupo COBALFI da Unioeste, e não apenas fornece suporte aos produtores no controle da mancha angular e do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, de forma mais consciente, segura ao meio ambiente, ao produtor e ao consumidor, mas apresenta mais uma opção de cultura, especialmente para o pequeno agricultor e para a produção orgânica, de alecrim e cúrcuma para suprir a demanda na elaboração do extrato a ser formulado após a obtenção de registro.

Estes extratos estão sendo registrados pela Unioeste, Campus de Marechal Cândido Rondon, e testados em diferentes culturas para ampliar a recomendação.

Após a obtenção do registro e início da formulação, concretizará, de fato, o objetivo da pesquisa em respaldar os agricultores no manejo correto de doenças em plantas e demonstrar que é possível produzir com menor agressão ao meio ambiente.