

Eugenol na indução de fitoalexina no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Eugenol in the induction of phytoalexine phaseoline in the bean culture (*Phaseolus vulgaris* L.)

<https://doi.org/10.32712/2446-4775.2022.1161>

Furlan, Marcos Roberto^{1*}; Bezerra, Antonio Carlos²; Lima, Marcos Barbosa²; Jesus, Fernanda Pereira de³; Souza, Andrea Dantas de².

¹Universidade de Taubaté, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação. Rua Visconde do Rio Branco, 210, Centro, CEP 12020-040, Taubaté, SP, Brasil.

²Faculdade Integral Cantareira - Associação João Meinberg de Ensino de São Paulo, Laboratório de Fitossanidade. Rua Marcos Arruda, 729, Belenzinho, CEP 03020-000, São Paulo, SP, Brasil.

³Universidade Federal do ABC (UFABC), Laboratório de Química, Avenida dos Estados, 5001, Bangu, Santo André, CEP 09210-580, SP, Brasil.

*Correspondência: furlanagro@gmail.com.

Resumo

O aumento expressivo da cadeia produtiva ocorre juntamente com objetivo de produzir alimentos com menores níveis de resíduos químicos e maior qualidade dos produtos. Um dos mecanismos naturais de defesa vegetal, induzida por atividades elicitoras, é a biossíntese de fitoalexinas, que são metabólitos secundários produzidos pela planta no local da infecção, e podem ser usadas para controle de pragas. Este trabalho teve como objetivo induzir a produção da faseolina no feijoeiro utilizando o eugenol como agente elicitor, pois o mesmo é conhecido por suas ações fungicida e bactericida. A metodologia aplicada foi adaptada e baseia-se em técnicas químicas e analíticas, visando a indução da faseolina na planta do feijoeiro através do agente elicitor eugenol. Uma vez induzida, a faseolina foi extraída em álcool etanol e sua leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS a 280 nm. Após o uso do eugenol (0,3%) na planta do feijoeiro, a produção de faseolina foi 4,22 vezes maior nesse tratamento quando comparada com o controle negativo (água) e 3,45 vezes maior em relação ao controle positivo (Bion[®]). De acordo com os resultados obtidos, confirmou-se que o eugenol possui ação elicitora sobre a planta do feijoeiro, pois induziu a produção da fitoalexina faseolina.

Palavras-chave: Biossíntese. Defesa vegetal. Metabólitos secundários. Elicitor.

Abstract

The expressive increase in the production chain occurs together with the objective of producing food with lower levels of chemical residues and higher product quality. One of the natural mechanisms of plant defense, induced by eliciting activities, is the biosynthesis of phytoalexins, That are secondary metabolites

produced by the plant at the site of infection and can be used for pest control. This work aimed to induce the production of phaseolin in common beans using eugenol as an elicitor, as it is already known for its fungicidal and bactericidal actions. The applied methodology was adapted and is based on chemical and analytical techniques aiming the phaseoline induction in the bean plant through the eugenol elicitor agent. Once induced, the phaseoline was extracted in ethanol ethanol and read on a 280 nm UV-VIS spectrophotometer. After the use of eugenol (0.3%) in the bean plant, the production of phaseolin was 4.22 times higher in this treatment when compared to the negative control (water) and 3.45 times higher in relation to the positive control (Bion®). According to the results obtained, it was confirmed that eugenol has an elective action on the bean plant, as it induced the production of phytoalexin phaseolin.

Keywords: Biosynthesis. Plant defense. Secondary metabolites. Elicitor.

Introdução

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

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

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

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

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

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção da fitoalexina faseolina em plântulas do feijoeiro, utilizando o eugenol como agente elicitor e o efeito no desenvolvimento inicial.

Material e Métodos

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

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

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

Indução da faseolina

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

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

Para cada tratamento foram selecionadas 50 sementes de feijão divididas em cinco repetições com 10 sementes cada. Os tratamentos e respectivas repetições, foram dispostos no delineamento inteiramente ao acaso.

Foram gotejados 0,25 mL da solução com eugenol de cada tratamento em todas as sementes e, logo após, foram semeadas em recipientes, utilizando-se como substrato, algodão umedecido.

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

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

Extração e quantificação da faseolina

Após seis dias de germinação, houve a contagem das sementes não germinadas, os hipocótilos das plantas foram medidos e os quatro maiores, dentro das repetições, foram selecionados para retirada de segmentos no tamanho de cinco centímetros por hipocótilo. Os quatro segmentos retirados de cada repetição foram pesados, acondicionados em papel de filtro, embebidos com 5 mL da respectiva solução tratamento (eugenol 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mL. L⁻¹; Bion 100ppm e Tween 0,2%) e mantidos em placa de Petri à temperatura ambiente (19 - 28°C) e ao abrigo de luz por 48 horas.

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

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

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

$$y = 6,1079x - 0,0068 \quad \text{Equação 1}$$

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

Resultados e Discussão

Os tamanhos médios dos hipocótilos de feijão são apresentados na **TABELA 1**.

TABELA 1: Tamanho médio dos hipocótilos de feijão Carioca, mantidos em temperatura ambiente (19 - 28°C) e ao abrigo de luz por seis dias.

Tratamentos	Média dos tamanhos (cm)
Água	7,475 a
Tween	6,800 a
Bion	6,620 a
Eugenol 0,1%	5,376 a
Eugenol 0,2%	6,514 a
Eugenol 0,3%	6,242 a

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5% pelo teste Tukey.

Coefficiente de variação: 31,36%.

A **TABELA 1** demonstra que não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos com relação ao tamanho médio dos hipocótilos de feijão.

A **TABELA 2** fornece as médias das porcentagens de germinação obtidas entre os tratamentos. Após seis dias de germinação, foi verificado que algumas sementes não germinaram.

TABELA 2: Média da porcentagem de germinação das sementes de feijão Carioca, mantidas em temperatura ambiente (19 - 28°C) e ao abrigo de luz por seis dias.

Tratamentos	Média (%)
Água	76 a
Tween	72 a
Bion	80 a
Eugenol 0,1%	58 b
Eugenol 0,2%	78 a
Eugenol 0,3%	80 a

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5% pelo teste Tukey.

Coefficiente de variação: 12,08%.

Por meio da **TABELA 2**, observa-se que ocorreram diferenças significativas ao nível de 5% pelo teste Tukey, entre o tratamento eugenol a 0,1% e os demais. Portanto, a concentração de eugenol a 0,1% proporcionou menor taxa de germinação entre as sementes do feijoeiro.

Os resultados analíticos foram obtidos em absorbância e as massas dos hipocótilos foram utilizadas para correção em absorbância/grama de peso fresco (Abs.gpf⁻¹). Foi verificado que todos os tratamentos foram capazes de induzir a produção da faseolina nas plântulas do feijoeiro (**TABELA 3**).

TABELA 3: Produção de faseolina em porcentagem de concentração, obtida de hipocótilos de plântulas de feijoeiro Carioca mantidos em temperatura ambiente (19 - 28°C) e ao abrigo de luz por seis dias.

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

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5% pelo teste Tukey.

Coefficiente de variação: 15,45%

Os resultados analíticos na **TABELA 3** das soluções controle positivo e negativo (Bion e água), demonstraram que não ocorreu diferença significativa entre ambos quanto à produção de faseolina no feijoeiro (concentração de 0,11% e 0,09% respectivamente). Nos tratamentos que foram utilizadas as soluções; eugenol 0,1%, 0,2% e 0,3% não ocorreram diferenças significativas entre as médias (0,27%, 0,31% e 0,38%, respectivamente).

A **TABELA 3** demonstra que ao comparar a produção de faseolina no tratamento eugenol a 0,3% com a faseolina encontrada no controle negativo (água), observou-se 4,22 vezes maior produção da fitoalexina no eugenol (3%) com relação à água. Na mesma Tabela se verifica que o eugenol (0,3%) produziu 3,45 vezes mais fitoalexina do que o produto referência (Bion®), enquanto Oliveira *et al.*^[11], testando preparados homeopáticos, verificaram aumento médio de 28,62% na produção de faseolina em plantas tratadas com óleo de *Eucalyptus citriodora* na dose 1% e 24CH.

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

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

Importante destacar que outros compostos ou extratos também demonstraram capacidade de estimular a produção de faseolina. O extrato aquoso de *Solanum mauritianum* induziu a produção dessa fitoalexinas^[14]. Filtrados dos fungos sapróbios *Curvularia inaequalis*, *Pseudobitritis terrestris*, *Memnomiella echinata* e *Curvularia eragrostidis* promoveram acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijão^[15]. A galactosamina e a sacarosamina aumentaram a concentração de faseolina e de coumestrol quase dez vezes em relação a mudas não estimuladas^[16].

A presença de faseolina nas plântulas tratadas com o controle negativo (água) e o agente emulsificante (Tween), pode ser devido ao estresse provocado pela falta de nutrientes das condições *in vitro* pelo qual as sementes e as plântulas foram submetidas, assim como aconteceu em todos os demais tratamentos.

Conclusão

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

Referências

1. Sumida CH, Fantin LH, Braga K, Canteri MG, Homechin M. Control of root rot (*Phytophthora cinnamomi*) in avocado (*Persea americana*) with bioagents. **Summa Phytopathol.** 2020; 46(3): 205-211. ISSN 1980-5454. [[CrossRef](#)].
2. Oliveira JC, Sales JF, Rubio-Neto A, Silva CF, Soares MA, Silva FG. Biological control in the germination of seeds from two species native of the Cerrado region. **Braz J Biol.** 2020; 81(1): 105-113. ISSN 1678-4375. [[CrossRef](#)].
3. Sampietro DA, Sampietro MSB, Vattuone MA. Efficacy of Argentinean propolis extracts on control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. **J Sci Food Agric.** 2020; 100(12): 4575-4582. ISSN 1097-0010. [[CrossRef](#)].
4. Stangarlin JR, Kuhn OJ, Toledo MV, Portz RL, Schwan-Estrada KRF, Pascholati SF. A Defesa vegetal contra fitopatógenos. **Sci Agrar Paran.** 2011; 10: 18-46. ISSN 1983-1471. [[CrossRef](#)].
5. Moreira CGÁ, Schwan-Estrada KRF, Bonaldo SM, Stangarlin JR, Cruz, MES. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa phytopathol.** 2008; 34(4): 332-337. ISSN 1980-5454. [[CrossRef](#)].

6. Guimarães LMP, Pedrosa EMR, Coelho RSB, Couto EF, Maranhão SRVL, Chaves A. Eficiência e atividade enzimática elicitada por metil jasmonato e silicato de potássio em cana-de-açúcar parasitada por *Meloidogyne incognita*. **Summa phytopathol.** 2010; 36(1): 11-15. ISSN 1980-5454. [[CrossRef](#)].
7. Silva HF, Pinto KMS, Nascimento LC, Silva EC, Souza WCO. Avaliação do uso de elicitores de resistência bióticos e abióticos contra a antracnose na videira (*Vitis labrusca* L.). **Summa Phytopathol.** 2019; 45(1): 70-75. ISSN 1980-5454. [[CrossRef](#)].
8. Biazon VL. **Crestamento bacteriano comum do feijoeiro: efeito da adubação nitrogenada e potássica e aspectos bioquímicos relacionados à doença.** Botucatu. 2003. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Agronomia] - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu. 2003.
9. Paxton J, Goodchild DJ, Cruickshank IAM. Phaseollin production by live bean endocarp. **Physiol Plant Pathol.** 1974; 4(2): 167-168. ISSN 0048-4059. [[CrossRef](#)].
10. Dixon RA, Dey PM, Lawton MA, Lamb CJ. Phytoalexin induction in french bean. **Plant Physiol.** 1983; 71(2): 251-256. ISSN 1532-2548. [[CrossRef](#)].
11. Oliveira JSB, Maia AJ, Schwan-Estrada KRF, Carneiro SMTPG, Bonato CM. Indução de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro por preparados homeopáticos de *Eucalyptus citriodora*. **Cad Agroecol.** 2011; 6(2): 1-5. ISSN 2236-7934. [[Link](#)].
12. Brand SC, Blume E, Muniz MFB, Milanesi PM, Scheren MB, Antonello LM. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Cien Rural.** 2010; 40(9): 1881-1887. ISSN 0103-8478. [[Link](#)].
13. Zubeck L, Silva JB, Mizuno MS, Hisano LK, Bonato CM, Schwan-Estrada KRF. **Prata coloidal como indutor de faseolina em hipocótilos de feijão.** In: Anais do 10º Encontro Internacional de Produção Científica; 2017 out. 24-26; Campinas, Brasil. [[Link](#)].
14. Telaxka FJ, Jaski JM, Scheffer DC, Gebauer JT, Moura GS, Franzener G. Extrato aquoso e fermentados de fumo-bravo (*Solanum mauritianum* Scop) na proteção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ao crestamento bacteriano comum. **Rev Bras Agropecu Sustent.** 2018; 8(3): 81-90. ISSN 2236-9724. [[CrossRef](#)].
15. Solino AJS, Schwan-Estrada KRF, Oliveira JSB, Ribeiro LM, Saab MF. Accumulation of phytoalexins in beans, soybeans and sorghum by fungal filtrates. **Rev Caatinga.** 2017; 30(4): 1073-1078. ISSN 1983-2125. [[CrossRef](#)].
16. Durango D, Quiñones W, Torres F, Rosero Y, Gil J, Echeverri F. Phytoalexin accumulation in colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. **Molecules.** 2002; 7 (11): 817-832. ISSN 1420-3049. [[CrossRef](#)].

Histórico do artigo | Submissão: 03/03/2021 | Aceite: 14/09/2021 | Publicação: 31/01/2022

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Como citar este artigo: Furlan MR, Bezerra AC, Lima MB, Jesus FP *et al*. Eugenol na indução de fitoalexina no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2022; Supl(1): 53-59. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/1161>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

