



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Coordenação de Capacitação
Divisão Apoio Técnico

PIBIC

2.356

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA
RELATÓRIO FINAL

**USO DE EXTRATOS DE FEIJÃO-MACUCO (*Pachyrhizus spp.*) NO
CONTROLE DE *Sclerotium rolfsii* NO CUBIU**

BOLSISTA: Rândrea Graziella Verçosa Guimarães

ORIENTADOR(A): César Augusto Ticona Benavente

Relatório Final apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a conclusão como participante do Programa de Iniciação Científica do INPA.

Manaus – Amazonas
2017

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Uso de extratos de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) no controle de *Sclerotium rolfsii* no cubiu

Resumo

A identificação de novos fungicidas naturais ampliam a possibilidade de melhorar a produtividade agrícola de produtores orgânicos ou daqueles com baixo investimento. As sementes de feijão-macuco têm se mostrado tóxicas por conter rotenona, o qual causa a morte celular, portanto, é possível que extratos destas sementes tenham ação contra o fungo *Sclerotium rolfsii*, principal doença do cubiu (*Solanum sessiliflorum*). Os objetivos deste trabalho foram determinar o grau de toxidez de sementes maduras e imaturas de 22 genótipos deste feijão, e avaliar sua eficiência no controle de *Sclerotium rolfsii* em plântulas de cubiu. O grau de toxidez foi avaliado em formigas (*Pheidole* sp.), seguindo o delineamento completamente casualizados com 22 extratos (1g/100ml), com 3 repetições, sendo uma placa de Petri com 20 formigas a unidade experimental. Contou-se o número de formigas vivas em intervalos de dez minutos durante uma hora. Com esses dados calculou-se a porcentagem de letalidade. Para avaliar o efeito dos extratos sobre *S. rolfsii*, inoculou-se escleródios do patógeno em plântulas de cubiu, seguindo o delineamento experimental de blocos completamente casualizados, com 4 tratamentos (extratos 1:100 e 1:1000 do genótipo P8, Cabrio Top® e água), 3 repetições e 8 plântulas por parcela. Os resultados mostraram que a letalidade dos extratos nas formigas após 10 minutos variou de 5,5-100% (sementes imaturas) e 99,3-100% (sementes maduras), isto prova que os extratos das sementes maduras têm poder inseticida. Os genótipos que tiveram letalidade 100% nos primeiros 10 minutos foram: P9, P58, P7, P61, P70, P28, e os menos letais foram: P50 (5,5%) e P5 (8,5%). No segundo experimento do controle de *S. rolfsii*, observou-se que o efeito do Cabrio Top® e do extrato com diluição 1:1000 por 20 minutos reduziram significativamente a incidência da doença em 90,3% e 60,2%, respectivamente. Portanto, a ação tóxica dos extratos de sementes maduras de feijão-macuco é mais eficaz no controle de formigas (*Pheidole* sp.). A eficiência do controle de *S. rolfsii* depende mais do tempo de ação do extrato que do seu poder letal. Os resultados mostram que as sementes maduras de feijão-macuco têm poder inseticida e fungicida.

Palavras Chave: Feijão-macuco. Rotenona. Fungicida. *Sclerotium rolfsii*.

Subárea: Agronomia

Financiamento: PIBIC/CNPq

Data: 31 / 10 / 17

CBL

Orientador (a)

Dr. César A. Ticona Benavente
Pesquisador Adjunto/INPA
Mat. 2071587

Randrea Graziella Verçosa Guimarães

Bolsista

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



INTRODUÇÃO

A identificação de novos fungicidas naturais amplia a possibilidade de melhorar a produtividade agrícola de produtores orgânicos ou daqueles com baixo investimento. As sementes de feijão-macuco têm se mostrado tóxicas para o homem e animais (Sorensen 1996), por conter rotenona em sua composição (Lautié *et al.* 2012). Extratos com estas sementes mostraram ação fungicida contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizopus stolonifer* (Barrera-Necha *et al.* 2004), portanto, é possível que tenham ação contra o fungo *Sclerotium rolfsii*, principal agente causal de doença do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal).

O feijão-macuco ou Jacatupé (assim chamado na região sudeste do Brasil) é uma hortaliça Fabaceae não convencional bem adaptada à região amazônica (Benavente e Silva 2016). Apenas suas raízes são comestíveis com elevado teor de proteínas (11%) (Zanklan *et al.* 2007), e produtividade de até 125,9 t ha⁻¹ (Nielsen *et al.* 2000). A parte aérea da planta não é comestível por conter substâncias tóxicas, como a isoflavona e rotenona (Leuner *et al.* 2013). As sementes de *Pachyrhizus* spp. têm mostrado citotoxicidade e genotoxicidade (Lautié *et al.* 2012; Lautié *et al.* 2013; Leuner *et al.* 2013; Estrella-Parra *et al.* 2014) em várias espécies de patógenos.

A rotenona causa morte celular devido à inibição no transporte de elétrons nas mitocôndrias, bloqueando a formação de ATP (Catteau *et al.* 2013). Nas sementes de feijão-macuco a rotenona representaria 1% da massa total (Grüneberg *et al.* 1999), variando de 1,13 a 2,76 mg g⁻¹ nas sementes moídas (Lautié *et al.* 2012). Assim, parece ser uma boa estratégia elaborar extratos de sementes de feijão-macuco com diferentes concentrações e determinar sua eficiência no controle de patógenos como o *Sclerotium rolfsii* do cubiu.

Sclerotium rolfsii é um fungo de solo que, no cubiu, causa podridão no colo das plantas, sejam plântulas ou plantas em plena frutificação (após cinco meses), com um micélio branco, onde, com o passar dos dias se desenvolvem escleródios marrons de um a dois mm de diâmetro. Dependendo do estágio de desenvolvimento vegetativo a morte é iminente e virá após alguns dias ou semanas. O controle desta doença normalmente é feito com fungicidas sintéticos e sistêmicos tais como o Tebuconazol (Duarte *et al.* 2006). Mas como o cubiu não é plantado em escala comercial não existem recomendações específicas para ela.

Este projeto teve o objetivo de determinar a concentração adequada de extrato de sementes de feijão-macuco no controle de *Sclerotium rolfsii* em plântulas de cubiu e selecionar os genótipos de maior efeito contra o fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de fitopatologia e melhoramento de plantas da COSAS/INPA (Coordenação de Pesquisas em Sociedade, Ambiente e Saúde / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia).

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



Os trabalhos foram feitos em duas etapas. Na primeira avaliava-se o efeito de extratos de sementes de genótipos de feijão-macuco sobre formigas da espécie *Pheidole* sp. Na segunda parte com os genótipos de letalidade diferenciada se fizeram testes de controle da doença em plântulas de cubiu infectadas com *Sclerotium rolfsii*.

Dentro da primeira etapa foram realizados dois experimentos de letalidade com extratos de diferentes genótipos de sementes de feijão-macuco com a concentração de 1:100 (1g em 100 ml), um com sementes imaturas de coloração verde (22 genótipos) e outro com sementes maduras de coloração bege, marrom claro a escuro (21 genótipos). O delineamento adotado em cada experimento foi o inteiramente casualizado com três repetições, a unidade experimental foi composta de uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro com 15 ml de extrato, e com aproximadamente 20 formigas (*Pheidole* sp.), escolheu-se este inseto por ser de fácil manipulação, e para a sua captura utilizou-se pedaços de salsicha hot-dog da Estrela Alimentos® dentro de um copo, e esperou-se 0,5-1 hora. Em cada experimento foi incluído um tratamento testemunha no qual apenas continha uma placa de Petri com água filtrada. Para avaliar a letalidade, contou-se o número de formigas vivas em intervalos de dez minutos durante uma hora. Com esses dados calculou-se a porcentagem de letalidade: $[1-NS/NT]*100$, sendo NS=número sobreviventes, NT=número total de formigas avaliadas.

Na segunda etapa, foi realizado testes seguindo o delineamento de blocos completamente casualizados, contendo quatro tratamentos, três repetições e oito plântulas por parcela. Foi feita uma incisão no caule das plântulas e os escleródios (produzidos em meio de cultura BDA) foram submersos nos extratos do genótipo P8 por um determinado tempo detalhado a seguir. Os tratamentos foram: duas diluições do 1:100 e 1:1000 com 10 e 20 minutos de tratamento dos escleródios, uma solução de Cabrio Top® (0,2 g para 50 ml de água filtrada – 1:100) por 1 minuto, e a testemunha foi imersa em água por 10 minutos. Para avaliar a incidência da doença, contou-se o número de plântulas vivas em intervalos de três dias durante 30 dias. Com esses dados se calculou a porcentagem da incidência: $[1-NPS/NTP]*100$, sendo NPS=número de plântulas sadias e NTP= número total de plântulas inoculadas. Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e teste de médias de Duncan ($P<0,05$). As análises foram realizadas no programa SAS procedimento PROC GLM (SAS, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 é mostrada a análise da variância do grau de toxidez dos extratos das sementes imaturas dos genótipos de feijão-macuco, onde se observa que existe diferença de poder letal entre os tratamentos dentro dos 10 a 60 minutos. Após 20 minutos todos os genótipos apresentaram 100% de letalidade sobre as formigas da espécie *Pheidole* sp. Portanto apresentamos apenas os resultados obtidos aos 10 minutos de tratamento (Tabela 2). Nesta tabela se observa que houve efeito dos tratamentos, porém não do tempo nem da interação Genótipo x Tempo. Isto indica que os tempos de 10 a 60 minutos não interferem na letalidade, porque a letalidade de 100% foi alcançada aos 10 minutos, sendo este tempo suficiente para avaliar o grau de toxidade dos extratos.

Tabela 1. Análise de variância do grau de toxidez de extratos de sementes imaturas de feijão-macuco (1:100) sobre formigas (*Pheidole* sp.) em uma hora.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Tratamentos	22	6461,82**	6342,57**	6180,16**	5587,52**	4630,94**	3763,66**
Erro	88	197,66	231,72	239,29	308,87	347,34	430,10
Total	110						
Coefficiente de variação (%)		33,92	28,25	25,10	26,33	26,17	28,00
Média		41,44	53,87	61,62	66,73	71,21	74,06

** , * , ns. Significativo a $P < 0,01$, a $P < 0,05$ e não significativo respectivamente pelo teste F.

QM: Quadrado Médio; GL: Graus de Liberdade

Na Tabela 3 são apresentadas as médias da letalidade em porcentagens, nela observa-se primeiro que existe diferença entre o tratamento com água e com os extratos. Isto prova que os extratos têm poder inseticida e que estaria correlacionado com o teor de rotenona, sendo assim espera-se que tenham um desempenho semelhante contra *Sclerotium rolfsii*. Segundo que existe variação na letalidade dos extratos, o que indicaria indiretamente a concentração de rotenona nas sementes. Assim os genótipos com maior teor de rotenona seriam P9, P58, P7, P61, P70, P28 e os com menores teores ou talvez comestíveis P50 (5,5%) e P5 (8,5%).

Na tabela 4 se observa que existe diferença de letalidade entre as médias dos extratos de sementes de feijão-macuco com a água nos 10 minutos de tratamento. Isto demonstra o poder letal das sementes maduras sobre as imaturas.

Quando se realizaram os testes com *Sclerotium rolfsii* em plântulas de cubiu se tiveram os seguintes resultados (Tabelas 5 e 6). Pela tabela 5 se observa que os tratamentos e os tempos de avaliação influenciaram a incidência da doença nas plantas, e pelo desdobramento da interação Tratamento x Tempo se observou que o efeito do Cabrio Top® e do extrato com diluição 1:1000 por 20 minutos dentro dos diferentes tempos não foi significativo o que indica que seu efeito inicial foi determinante, e pela Tabela 6 se observou que seus efeitos foram significativos reduzindo a incidência da doença. Esta redução foi de 90,3% para Cabrio Top® e 60,2% para o extrato de P8 (1:1000 por 20 min) se comparada com o tratamento testemunha (água por 10 min).

Tabela 2. Análise de variância da letalidade de extratos de sementes maduras de feijão-macuco 1:100 sobre formigas (*Pheidole* sp.) durante 10 minutos.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
Genótipo	21	30849,88**
Tempo	5	26,29 ns
Genótipo x Tempo	105	153,56 ns
Erro	426	261,19
Total	557	
Coeficiente de Variação (%)		21,13
Média		76,45

** , * , ns. Significativo a $P < 0,01$, a $P < 0,05$ e não significativo respectivamente pelo teste F.

GL: Graus de Liberdade.

Tabela 3. Médias de letalidade de diferentes genótipos de sementes imaturas de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.), para formigas (*Pheidole* sp.) in vitro após exposição por diferentes períodos.

Genótipo	Letalidade (%)					
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
P9	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P58	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P7	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P61	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P70	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P28	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P42	94,2 ab	94,2 ab	98,1 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P63	90,3 abc	96,9 ab	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P51	73,7 cd	94,4 ab	96,4 a	98,2 a	100,0 a	100,0 a
P20	66,8 cd	90,4 ab	95,2 a	97,6 a	100,0 a	100,0 a
P8	65,7 d	80,9 abc	93,6 a	95,3 a	100,0 a	100,0 a
P40	64,9 d	93,0 ab	95,4 a	97,6 a	100,0 a	100,0 a
P52	54,0 de	78,1 abc	88,9 a	94,5 a	97,6 a	97,6 a
P39	53,3 de	76,6 abc	90,0 a	93,3 a	100,0 a	100,0 a
P49	52,3 de	76,1 abc	85,7 a	90,4 a	90,4 ab	90,4 a
P62	48,7 def	78,3 abc	87,5 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P17	30,4 efg	45,7 de	83,8 a	97,7 a	100,0 a	100,0 a
P48	29,6 efg	68,5 cd	80,4 a	82,7 a	87,7 ab	87,7 a
P59	26,1 fg	61,9 cd	83,3 a	92,8 a	100,0 a	100,0 a
P41	24,2 fg	56,7 cd	87,7 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
P5	8,5 g	25,76 ef	48,4 b	54,5 b	63,1 bc	71,7 ab
P50	5,5 g	5,5 f	12,96 c	22,2 c	34,2 c	45,8 b
Água	9,6 g	17,9 f	23,48 c	30,1 bc	37,4 c	43,1 b
Média	60,77	75,68	84,81	88,99	91,75	92,88

¹Letras diferentes indicam diferença significativa das médias pelo teste de Duncan ($P < 0,05$)

Tabela 4. Médias de letalidade de diferentes genótipos de sementes maduras de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.), para formigas (*Pheidole* sp.) in vitro após exposição por 10 minutos.

Genótipo	Letalidade (%)	Genótipo	Letalidade (%)	Genótipo	Letalidade (%)
P5	100,0 a	P40	100,0 a	P52	100,0 a
P7	100,0 a	P41	100,0 a	P58	100,0 a
P8	100,0 a	P42	100,0 a	P59	100,0 a
P9	100,0 a	P48	100,0 a	P61	100,0 a
P17	100,0 a	P49	100,0 a	P62	100,0 a
P20	100,0 a	P50	100,0 a	P63	99,3 a
P28	100,0 a	P51	100,0 a	Água	27,0 b
P39	100,0 a				

Tabela 5. Análise de variância da incidência da doença em plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) em 30 dias.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
Bloco	2	812,17 ns
Tratamento	3	17697,48 *
Erro 1	6	2331,27 **
Tempo	7	620,34 **
Erro 2	14	42,08 *
Tratamento x Tempo	21	92,07 **
Cabrio Top® (1:100/ 1 min)	7	28,83 ns
Extrato de 'P8' (1:100/10 min)	7	519,90 **
Extrato de 'P8' (1:1000/20 min)	7	28,83 ns
Água por 10 min.	7	319,01 **
Erro 3	42	16,04
Coeficiente de Variação (%)		10,75
Média		37,23

Tabela 6. Médias para a incidência de *Sclerotium rolfsii* em plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) após 30 dias de inoculação de escleródios.

Tratamento	Incidência (%)
Extrato de 'P8' (1:100/10 min)	60,94 a
Água por 10 min.	58,85 a
Extrato de 'P8' (1:1000/20 min)	23,44 b
Cabrio Top® (1:100/ 1 min)	5,73 b

CONCLUSÃO

Pode-se concluir deste projeto que:

1- Em geral, ação tóxica dos extratos de sementes maduras de feijão-macuco é mais eficaz no controle de formigas (*Pheidole* sp.) e de *Sclerotium rolfsii* que as de sementes imaturas. Existindo

genótipos que mesmo imaturos já teriam elevada concentração de rotenona tais como P9, P58, P7, P61, P70 e P28.

2- O Cabrio Top® controla *Sclerotium rolfsii* em plântulas de cubiu.

3- O extrato do genótipo P8 na diluição 1:1000 por 20 minutos foi a mais eficiente para o controle de *Sclerotium rolfsii* no cubiu.

Mais ainda, pode-se ressaltar que as sementes de feijão-macuco dos genótipos P5 e P50 seriam comestíveis apenas quando imaturas.

REFERÊNCIAS

Barrera-Necha, L.L.; Bautista-Baños, S.; Bravo-Luna, L.; García-Suarez, F.J.L. 2004. Antifungal activity of seed powders, extracts and secondary metabolites of *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban (Fabaceae) against three postharvest fungi. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 22: 356-361.

Catteau, L.; Lautié, E.; Kone, O.; Coppée, M.; Hell, K.; Pomalegni, C.B.; *et al.* 2013. Degradation of Rotenone in Yam Bean Seeds (*Pachyrhizus* spp.) through Food Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 11173-11179.

Duarte, M.L.R.; Tabaranã, M.G.F.; Albuquerque, F.A.B.; Moraes, A.J.G. 2006. Controle Químico da Podridão-das-estacas (*Sclerotium rolfsii*) da Pimenteira-do-reino. Embrapa Amazônia Oriental, 157: 1-2 (www.infoteca.cnptia.embrapa.br). Acesso em 22/03/2017.

Estrella-Parra, E.A.; Gomez-Verjan, J.C.; Gonzalez-Sanchez, I.; Vazquez-Martinez, E.R.; Vergara-Castaneda, E.; Cerbon, M.A.; *et al.* 2014. Rotenone isolated from *Pachyrhizus erosus* displays cytotoxicity and genotoxicity in K562 cells. *Natural Product Research*, 28: 1780-1785.

Grüneberg W.J.; Goffman F.D.; Velasco L. 1999. Characterisation of Yam Bean (*Pachyrhizus* spp) seeds as potential sources of high palmitic acid oil. *JAOCS*, 76: 1309-1312.

Lautié, E.; Rozet, E.; Hubert, P.; Leclercq, J.Q. 2012. Quantification of rotenone in seeds of different species of yam bean (*Pachyrhizus* sp.) by a SPE HPLC-UV method. *Food Chemistry*, 131: 1531-1538.

Lautié, E.; Rozet, E.; Hubert, P.; Vandelaer, N.; Billard, F.; ZumFelde, T.; *et al.* 2013. Fastmethod for the simultaneous quantification of toxic polyphenols applied to the selection of genotypes of yam bean (*Pachyrhizus* sp.) seeds. *Talanta*, 117: 94-101.

Leuner, O.; Havlik, J.; Budesinsky, M.; Vrkoslav, V.; Chu, J.; Bradshaw, T.D.; *et al.* 2013. Cytotoxic Constituents of *Pachyrhizus tuberosus* from Peruvian Amazon. *Natural Product Communications*, 8: 1423-1426.

Nielsen, P.E.; Sørensen, M.; Halafihi, M. 2000. Yield potential of Yam Bean (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban) accessions in the Kingdom of Tonga, South Pacific. *Tropical Agriculture*, 77: 174-179.

SAS Institute. 2011. The SAS system for Windows. Release 9.2. SAS Inst. Cary, NC.

Silva, E.S.D.; Benavente, C.A.T. 2016. Diversity of yam bean (*Pachyrhizus* spp. Fabaceae) based on morphoagronomic traits in the Brazilian Amazon. *Acta Amazonica*, 46: 3, 233-240.

Sorensen, M. 1996. Yam bean (*Pachyrhizus* DC.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, p. 1-141. In: Heller, J.; Hammer, K. (Ed.). *Schriften zu Genetischen Ressourcen*. v.2. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Rome.

Zanklan, A.S.; Ahouangonou, S.; Becker, H.C.; Pawelzik, E.; Grueneberg, W.J. 2007. Evaluation of the storage root-forming legume yam bean (*Pachyrhizus* spp.) under West African conditions. *Crop Science*, 47: 1934-1946.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

