

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO

SELEÇÃO DE PROGÊNIES DE FEIJÃO-MACUCO (*Pachyrhizus* spp.) PARA O
CONTROLE DE *Ralstonia solanacearum*

RÂNDREA GRAZZIELLA VERÇOSA GUIMARÃES

Manaus, Amazonas

Junho, 2023

RÂNDREA GRAZZIELLA VERÇOSA GUIMARÃES

**SELEÇÃO DE PROGÊNIES DE FEIJÃO-MACUCO (*Pachyrhizus* spp.) PARA O
CONTROLE DE *Ralstonia solanacearum***

Orientador: CÉSAR AUGUSTO TICONA BENAVENTE

Coorientador: LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Manaus, Amazonas

Junho, 2023



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO MESTRADO

Ata da Defesa Pública de **RÂNDREA GRAZZIELLA VERÇOSA GUIMARÃES**, ocorrido no dia 24/05/2023, no Auditório do PPG-ATU, prédio 139, Campus III do Inpa.

Aos vinte e quatro dias de maio de 2023, às 9h (horário de Manaus/AM), realizou-se a Defesa Pública de Dissertação de **RÂNDREA GRAZZIELLA VERÇOSA GUIMARÃES**, aluna do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Agricultura no Trópico Úmido, intitulada "Seleção de progênies de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) para o controle de *Ralstonia solanacearum* e *Sclerotium rolfsii*", sob a orientação do Dr. César Augusto Ticona Benavente (Inpa), em conformidade com o Art. 52 do Regimento Geral da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI/Inpa) e Art. 60 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, como parte das atividades para conclusão e obtenção do título de **Mestre em Agricultura no Trópico Úmido**. A **Banca Examinadora** foi constituída pelos seguintes membros: Ricardo Lopes (Embrapa), André Luis Willerding (CBA) e Everton Rabelo Cordeiro (Embrapa) e tendo como suplente o seguinte membro: Francisco Adilson dos Santos Hara (Ufam). O Presidente da Banca Examinadora deu início à Seção e informou os procedimentos do exame. A aluna fez uma exposição do seu estudo e ao término foi arguida oralmente pelos membros da Comissão. Após as arguições os membros da banca se reuniram para avaliação e chegaram ao seguinte parecer:

Nome	Parecer	Assinaturas
Ricardo Lopes	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovou () Reprovou	
André Luis Willerding	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovou () Reprovou	
Everton Rabelo Cordeiro	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovou () Reprovou	
Menção:	() "Com Distinção" () "Com Distinção e Louvor"	

G963s Guimarães, Rândrea Graziella Verçosa
Seleção de progênies de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) para o controle de *Ralstonia solanacearum* / Rândrea Graziella Verçosa Guimarães; orientador César Augusto Ticona Benavente; coorientador Luiz Antonio de Oliveira. - Manaus: [s.l.], 2023.

2,83 MB
99p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Agricultura em Trópico Úmido) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. Melhoramento genético. 2. Produtividade de sementes. 3. Atividade bactericida. I. Benavente, César Augusto Ticona. II. Oliveira, Luiz Antonio de. III. Título

CDD 583.74

A Deus, ao meu amado esposo Wallace Cevalho, à minha família, sobretudo à minha mãe Andréa Verçosa e aos meus irmãos, aos meus avós Maria do Disterro e Paulo Verçosa (*in memoriam*), e à Jesuína Teixeira, dedico esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me capacitar, fortalecer, iluminar meu caminho e abençoar-me com este momento.

Ao meu amado esposo, Wallace Cevalho, pelo companheirismo, cumplicidade, paciência e compreensão, tornando o fardo mais leve.

Aos meus pais e irmãos, em especial à minha mãe Andréa Verçosa, por toda a estrutura e incentivo. Aos meus avós, Maria do Disterro e Paulo Verçosa (*in memoriam*), e à minha madrinha, Jesuína Teixeira, pelo suporte na minha criação e educação.

Aos meus sogros, Jucilene Cevalho e Inácio Tavares, minha segunda família.

Aos meus amigos, Adriana Costa, Jorge Luís e Ramom Castro, pelo incentivo diante dos desafios do mestrado.

Ao professor César Ticona Benavente pela orientação, conselhos, disponibilidade em ajudar-nos e pela amizade sincera.

Ao meu coorientador, Luis Antonio de Oliveira, pela grande ajuda com fornecimento de espaço, materiais para a realização deste trabalho e, sobretudo, amparo.

Aos meus amigos do laboratório de Melhoramento Genético de Hortaliças, em especial a Thiago Moraes, Camila Fonseca e Álvaro Brasil, pelo companheirismo e amizade. Aos colegas Leandro Silva, Maria Oliveira, Katrine Castro, Leandra Santos, Guilbert Rodrigues, Natalia Mendonça e Vanessa Silva pelo apoio e ajuda em campo.

Aos colegas do laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia, em especial a Fabíola Santana, Cassiane Minelli, Nadionara Menezes, Suziane Rodrigues e Ítalo Sampaio, pelo acolhimento.

Aos técnicos, seu Tirico, seu Ronaldo, seu Newton, seu Alexandre (vulgo Gato) e Ariel, pela disponibilidade e suporte.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e PPG-ATU por toda a infraestrutura fornecida e a oportunidade de realizar este Mestrado, em especial ao professor Rogério Hanada.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa concedida.

A todos os professores que auxiliaram na minha formação escolar e acadêmica.

Aos membros da banca avaliadora, professores Ricardo Lopes, André Willerding e Everton Ribeiro, pela contribuição.

Os meus sinceros agradecimentos.

“Consagra ao Senhor tudo o que fazes, e os teus planos serão bem-sucedidos.”

(Provérbios 16)

RESUMO

O programa de melhoramento genético do feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia selecionou nove progênies para o controle de *Sclerotium rolfsii*. No entanto, elas não foram avaliadas quanto à sua produtividade de sementes e sua eficácia no controle de *Ralstonia solanacearum* (RS). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar e selecionar progênies de feijão-macuco com elevada produtividade de sementes e elevada toxicidade contra RS filotipo II. O experimento agrônomico foi conduzido em um delineamento de blocos completamente casualizados com nove tratamentos, quatro repetições e quatro plantas por parcela; sendo conduzidas com auxílio de tutores de 2 m de comprimento. Os testes de toxicidade foram realizados usando três métodos: contagem de células em Câmara de Neubauer (CN), espectrofotometria (EF) e difusão em disco (DD). Os resultados demonstraram que as progênies não apresentaram diferenças significativas na produtividade de sementes, variando de 0,56 (P5) a 0,98 t ha⁻¹ (P23). As contagens na CN e EF mostraram que os extratos aquosos de sementes de *Pachyrhizus* spp. a 5%, após 24 horas, promoveram a multiplicação de RS filotipo II. No entanto, as contagens na CN mostraram que os extratos com concentração de 0,5%, em geral, reduzem a multiplicação de RS. Na contagem DD, os extratos a 5% exibiram halos inibitórios variando de 0,26 a 1,45 mm em 12 horas, e halos estimulatórios de até 8,08 mm em 48 horas. As progênies P23 e P14 mostraram-se promissoras para serem usadas como biopesticidas na concentração de 0,5% no controle de RS, com produtividade de sementes de 0,98 e 0,83 t ha⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: jacatupé, melhoramento, bioatividade, bactericida.

ABSTRACT

The genetic improvement program of yam bean (*Pachyrhizus* spp.) at the National Institute of Amazonian Research selected nine progenies for the control of *Sclerotium rolfsii*. However, they were not evaluated for their seed productivity and their efficacy in controlling *Ralstonia solanacearum* (RS). Therefore, the aim of this study was to evaluate and select yam bean progenies with high seed productivity and high toxicity against RS phylotype II. The agronomic experiment was conducted in a completely randomized block design with nine treatments, four replicates, and four plants per plot, using 2 m long tutors. Toxicity tests were performed using three methods: cell counting in a Neubauer Chamber (NC), spectrophotometry (SP), and disk diffusion (DD). The results showed that the progenies did not present significant differences in seed productivity, ranging from 0.56 (P5) to 0.98 t ha⁻¹ (P23). Cell counting in NC and SP showed that aqueous extracts of *Pachyrhizus* spp. seeds at 5%, after 24 hours, promoted the multiplication of RS phylotype II. However, cell counts in NC showed that extracts with a concentration of 0.5%, in general, reduced the multiplication of RS. In the DD count, the 5% extracts exhibited inhibitory halos ranging from 0.26 to 1.45 mm in 12 hours and stimulating halos of up to 8.08 mm in 48 hours. Progenies P23 and P14 proved promising for use as biopesticides at a concentration of 0.5% in RS control, with seed productivity of 0.98 and 0.83 t ha⁻¹, respectively.

Key words: jacatupé, improvement, bioactivity, bactericidal.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 O gênero <i>Pachyrhizus</i>	17
2.2 Descrição botânica	19
2.3 Domesticação e melhoramento	20
2.4 Cultivo e produtividade.....	23
2.5 Principais doenças e pragas	27
2.6 Composição química das raízes	31
2.7 Uso das raízes	32
2.8 Composição das sementes.....	33
2.9 Uso das sementes	35
2.10 Rotenona	39
2.11 Extração da rotenona.....	42
2.12 Teste de progênes.....	46
2.13 Índice de seleção	47
2.14 Complexo <i>Ralstonia solanacearum</i>	48
3. OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral.....	51
3.2 Objetivos específicos	51
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 Etapa I. Teste de progênes para produtividade de sementes.....	52
4.2 Etapa II. Teste de progênes no controle <i>in vitro</i> de <i>Ralstonia solanacearum</i>	53
4.2.1 Contagem de células em Câmara de Neubauer	55
4.2.2 Leitura de absorbância em espectrofotômetro	56
4.2.3 Difusão em disco em meio sólido LPGA (levedura-peptona-glucose-ágar)	57
4.3 Etapa III. Seleção de progênes de feijão-macuco	58
4.4 Análise estatística.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Etapa I. Teste de progênes pela produtividade de sementes.....	60
5.2 Etapa II. Teste de progênes no controle <i>in vitro</i> de <i>Ralstonia solanacearum</i>	65

5.2.1 Contagem de células bacterianas em Câmara de Neubauer	65
5.2.1.1 Testes com extratos de feijão-macuco a 5%	65
5.2.1.2 Testes com extratos de feijão-macuco a 0,5%	67
5.2.2 Leitura da absorbância em espectrofotômetro	70
5.2.2.1 Testes com extratos de feijão-macuco a 5%	70
5.2.2.2 Testes com extratos de feijão-macuco a 0,5%	73
5.2.3 Difusão em disco em meio sólido.....	76
5.2.3.1 Halos de inibição	76
5.2.3.2 Halos de estímulo	79
5.3 Etapa III. Seleção de progênies pelo Índice Mulamba e Mock (1978).....	80
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
7. CONCLUSÕES	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
10. ANEXO A - Análise de solo da Estação Experimental Alejo Von Der Pahlen 2021.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomes populares de espécies cultivadas de <i>Pachyrhizus</i> spp.	18
Tabela 2. Grupos e raças das cultivares de <i>Pachyrhizus tuberosus</i>	21
Tabela 3. Nematoides relatados em raízes de <i>Pachyrhizus</i> spp.	29
Tabela 4. Fungos que atacam <i>Pachyrhizus</i> spp.	30
Tabela 5. Compostos tóxicos isolados das sementes de <i>Pachyrhizus</i> spp.....	34
Tabela 6. Teores de rotenona nas sementes de <i>Pachyrhizus</i> spp.....	40
Tabela 7. Sementes de <i>Pachyrhizus</i> spp. utilizadas para o teste de toxicidade sobre <i>Ralstonia solanacearum</i>	54
Tabela 8. Análise de variância na produção de vagens e de sementes de feijão-macuco (<i>Pachyrhizus</i> spp.) em Espodossolo arenoso. Amazonas, 2021.....	60
Tabela 9. Médias de características e produtividade de vagens e sementes de progênies de feijão-macuco (<i>Pachyrhizus</i> spp.) produzidas em Espodossolo arenoso. Amazonas, 2021. ...	60
Tabela 10. Cores das sementes de <i>Pachyrhizus</i> spp. produzidas em Espodossolo arenoso.....	64
Tabela 11. Análise de variância do número de células de <i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo II em meio líquido de zero a 24 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 5%.	65
Tabela 12. Médias do número de células de <i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo II em meio líquido de zero a 24 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 5%.....	66
Tabela 13. Análise de variância do número de células de <i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo II em meio líquido de zero a 24 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 0,5%.	67
Tabela 14. Médias do número de células de <i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo II em meio líquido de zero a 24 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 0,5%.....	68
Tabela 15. Análise de variância da absorbância dos tratamentos de zero a 24 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 5%.	70
Tabela 16. Médias da absorbância dos tratamentos de zero a 24 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 5%.	71
Tabela 17. Análise de variância da absorbância dos tratamentos de zero a 24 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 0,5%.	73
Tabela 18. Médias da absorbância dos tratamentos de zero a 24 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 0,5%.	74
Tabela 19. Análise de variância dos halos de inibição e de estímulo bacteriano de <i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo II em meio sólido de seis a 48 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 5%.	77

Tabela 20. Médias dos halos de inibição e estímulo bacteriano de <i>Ralstonia solanacearum</i> filotipo II em meio sólido de 12 a 48 horas. Extratos de <i>Pachyrhizus</i> spp. a 5%.	77
Tabela 21. Seleção de progênes pelo índice Mulamba e Mock (1978).....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta com flores violetas (A); vagens (B); e sementes (C) de <i>Pachyrhizus</i> spp.	19
Figura 2. Diferentes formatos de raízes de <i>Pachyrhizus</i> spp.: arredondadas (A, B e C) e alongadas (D, E e F).	20
Figura 3. Gravuras de <i>Pachyrhizus</i> ahipa na cultura nazca.	22
Figura 4. Preparo de leiras para plantio de <i>Pachyrhizus</i> spp.	24
Figura 5. Tutoramento em plantio de <i>Pachyrhizus</i> spp.	25
Figura 6. <i>Cerotoma</i> spp. em folha de <i>Pachyrhizus</i> spp.	27
Figura 7. A) Plântula de cubiu inoculada com escleródio de <i>S. rolfsii</i> banhado em extrato das sementes de <i>Pachyrhizus</i> spp.; B) Plântula de cubiu inoculada com escleródio banhado com água.	36
Figura 8. A) Comportamento da progênie P5; e B) da progênie P15 de <i>Pachyrhizus</i> spp. na inibição de <i>S. rolfsii</i> <i>in vitro</i>	37
Figura 9. Cinco complexos proteicos da cadeia respiratória mitocondrial. No complexo I, a NADH cede um elétron o qual é conduzido até o complexo IV. A seu passo cria uma concentração de prótons no espaço intermembrana. O complexo V traz de volta os prótons para a matriz mitocondrial e se fabrica ATP.	40
Figura 10. Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial onde o elétron cedido pelo NADH é conduzido até a coenzima Q10.	41
Figura 11. Plantio de feijão-macuco (<i>Pachyrhizus</i> spp.).	53
Figura 12. Esquema de avaliação dos halos de inibição e estímulo em meio LPGA.	58
Figura 13. Fluxograma de etapas metodológicas.	59
Figura 14. A) Flores violetas e B) brancas de <i>Pachyrhizus</i> spp.	63
Figura 15. Sementes colhidas de nove progênies de feijão-macuco (<i>Pachyrhizus</i> spp.).	63
Figura 16. A) <i>Bombus atratus</i> na flor de <i>Pachyrhizus</i> spp.; B) aparelho reprodutor da flor exposto.	64
Figura 17. Halo de inibição e de estímulo de <i>Ralstonia solanacearum</i> proveniente da ação do extrato P61v em 12 horas. O disco central possui o tratamento controle de antibiótico na dose de 300 mg L ⁻¹	76

1. INTRODUÇÃO

O feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) pertence à família Fabaceae, com cinco espécies identificadas: *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng., *P. erosus* (L.) Urb., *P. ahipa* (Wedd.) L.Parodi, *P. ferrugineus* (Piper) M.Sørensen e *P. panamensis* Clausen (Sørensen 1996). Espécies deste gênero são adaptadas aos solos pobres das regiões amazônica e andina (Nielsen *et al.* 2000; Tapia e Sørensen 2003). O gênero *Pachyrhizus* produz raízes tuberosas comestíveis ricas em proteínas (18% na base seca), e sua produtividade pode chegar a até 108 t ha⁻¹ (Zanklan *et al.* 2007; Silva *et al.* 2016). No entanto, suas sementes são tóxicas devido à presença de rotenona. O teor desta substância varia de 1,13 a 3,53 mg g⁻¹ na base seca (Lautié *et al.* 2012; Lautié *et al.* 2013b).

Tradicionalmente, a toxicidade dessas sementes já era reconhecida na Amazônia. Os indígenas preparavam extratos, os quais eram vertidos nos rios ou lagos antes da pesca (Crombie e Whiting 1998). Pesquisas científicas têm demonstrado que os extratos dessas sementes são eficazes no controle de vários fitopatógenos (Barrera-Necha *et al.* 2004; Barbosa *et al.* 2018; De Lima *et al.* 2021) e insetos (Béjar *et al.* 2000; Basukriad e Wilkins 2014; Reddy 2015).

A rotenona já foi amplamente utilizada como pesticida principal na agricultura e agora está voltando a ter importância. Ela era originalmente extraída das raízes do timbó (*Derris* spp.) na década de 1930, mas devido ao surgimento de pesticidas sintéticos, especialmente o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), foi abandonada na década de 1940 (Chaim e Castro 2003). A partir da década de 1950, começou-se a observar o grave impacto ambiental dos pesticidas sintéticos, o que fez com que os compostos à base de rotenona recuperassem relevância (Borsoi *et al.* 2014).

A indústria química de agrotóxicos enfrenta o desafio de produzir pesticidas sintéticos que sejam seguros para a saúde humana e para o meio ambiente (Isman 2008). Portanto, novas pesquisas têm sido realizadas para encontrar biopesticidas com ação potente, mas que sejam biodegradáveis em um curto período de tempo. Atualmente, no mercado, os inseticidas de origem vegetal estão limitados principalmente a piretrinas, neem (*Azadirachta indica*), óleos de alho, limoneno, *Chenopodium*, oleorresina de *Capsicum* e pó de Derris (Isman 2020).

Dentre os biopesticidas, a rotenona mostrou elevado poder tóxico e rápida biodegradabilidade. Ela apresenta baixa toxicidade em mamíferos (DL₅₀= 100 mg kg⁻¹ de peso corporal em ratos) (Mascaro *et al.* 1998) e humanos (DL₅₀= 300–500 mg kg⁻¹ de peso corporal) (De Wilde 1986), além de causar baixo impacto ambiental devido à rápida decomposição no

ambiente (vida média de quatro dias) (Cabras *et al.* 2002). Além disso, a rotenona não induz resistência em doenças e pragas (George *et al.* 2014).

A extração da rotenona a partir da planta é relativamente simples e requer pequenas quantidades de amostras. Como a rotenona possui uma polaridade intermediária, é geralmente extraída com água ou com solventes orgânicos, como metanol e clorofórmio (Kim *et al.* 2009; Lautié *et al.* 2013a). Sua extração pode ser realizada por meio de métodos como maceração, Soxlet, extração com líquido pressurizado, extração acelerada com solvente, extração com fluido supercrítico, extração assistida por micro-ondas ou extração ultrassônica (Ong 2004; Sae-Yun *et al.* 2006; D'Andrea *et al.* 2007; Lautié *et al.* 2012). Dentre esses métodos, a maceração é a mais simples, e o período de extração varia de três horas a três semanas (Zubairi *et al.* 2016).

No Brasil, o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) conserva 64 acessos de *Pachyrhizus* (Silva *et al.* 2016). Em 1990, já conservava 13 acessos de *P. tuberosus* e *P. erosus* provenientes do Mato Grosso (Brasil) e do México, respectivamente (Silva *et al.* 2016). Contudo, houve perda de identidade taxonômica devido a cruzamentos naturais, nos quais foi observada variação nas cores das flores e sementes dentro dos acessos, resultando em novas seleções que resultaram 64 progênies (Silva Filho *et al.* 1997; Silva *et al.* 2016). Essas progênies foram avaliadas agronomicamente para dar início a um programa de melhoramento visando aumentar a produtividade das raízes (Ribeiro *et al.* 2011; Silva *et al.* 2016). Recentemente, também foi iniciado um programa para aumentar a toxicidade e a produtividade das sementes, visando o controle de doenças e pragas.

Estudos da bioatividade dos extratos aquosos de sementes das 64 progênies identificaram as progênies P1, P5, P14, P15, P20, P23, P46, P61 e P64 como as mais tóxicas e eficientes no controle *in vitro* do fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. (De Lima *et al.* 2021). Portanto, é necessário avaliar a eficiência de extratos dessas progênies no controle de outros fitopatógenos, bem como determinar o potencial produtivo de sementes de cada progênie.

Este trabalho tem como objetivo selecionar progênies de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) com elevada produtividade de sementes e toxicidade para *Ralstonia solanacearum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Pachyrhizus*

O gênero neotropical *Pachyrhizus* Richard ex DC. pertence à família Fabaceae e à subfamília Faboideae (Papilionoideae) (EPPPO 2021). Este gênero compreende cinco espécies distintas que são divididas em dois grupos: as cultiváveis e as silvestres. No primeiro grupo, encontram-se as espécies *P. ahipa*, *P. erosus* e *P. tuberosus* (Noda *et al.* 1984; Sørensen 1996). No grupo das espécies silvestres, estão *P. ferrugineus* e *P. panamensis* (Sørensen 1996).

A origem geográfica das espécies ainda é incerta. Alguns estudos sugeriram que *Pachyrhizus tuberosus*, *P. ahipa* e *P. panamensis* podem ser originários da América do Sul (Sørensen *et al.* 1997a; Ørting *et al.* 1996; Ildis 2006). *Pachyrhizus tuberosus*, por exemplo, é possivelmente originário da Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (Ildis 2006). *Pachyrhizus erosus* seria originário da América Central e do México (Ørting *et al.* 1996; Ildis 2006), enquanto *Pachyrhizus ferrugineus* teria sua origem na América Central e na Colômbia (Ildis 2006).

Pachyrhizus ahipa é encontrado nos vales andinos da Bolívia, Peru e no Norte da Argentina (Santayana *et al.* 2014; Ildis 2006). *Pachyrhizus erosus* tem sua distribuição nas regiões tropicais dos principais continentes (Ildis 2006). *Pachyrhizus ferrugineus* está amplamente distribuído na América Central, Colômbia e México (Ildis 2006; GBIF 2021). *Pachyrhizus panamensis* pode ser encontrado no Panamá, Colômbia e Equador (Ildis 2006). *Pachyrhizus tuberosus* tem ocorrência no Caribe, Ásia e na América do Sul (Ildis 2006; Santayana *et al.* 2014).

As comunidades andinas desempenharam um papel fundamental na diversificação de *Pachyrhizus* spp. (Sørensen *et al.* 1997b). Os agricultores e camponeses tradicionais cultivavam essas plantas em diversas altitudes e ambientes, permitindo a seleção natural das mais adaptadas (Sørensen *et al.* 1997b). Essa prática ao longo do tempo resultou em adaptações das plantas a diferentes tipos de solo, temperaturas e níveis de umidade (Sørensen *et al.* 1997b).

A diversidade genética de *Pachyrhizus* é predominante em nível local, mas a identificação de parentes selvagens é restrita (Santayana *et al.* 2014; Delêtre *et al.* 2017). A cultura apresenta uma variedade de cultivares e raças locais dentro de suas três espécies domesticadas, que se distinguem por suas características fisiológicas e morfológicas (Sørensen 1996). O nome popular dessas plantas varia de acordo com a espécie e a região, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Nomes populares de espécies cultivadas de *Pachyrhizus* spp.

Espécie	Nome popular	Idioma	Região
<i>P. ahipa</i>	Inhame andino	Português	Brasil
	Ahipa, aricoma, yaspo	Espanhol	-
	Asipa	Quechua	Peru
	Ajipa	Quechua	Bolívia
	Villu	Aimará	Peru
<i>P. erosus</i>	Jicama, feijão-inhame, inhame mexicano	Português	Brasil
	Mbakuku	Guarani	Brasil*
	Jícama, jícama de agua	Espanhol	México
	Mexican yam bean, turnip bean	Inglês	Estados Unidos
	Fagiolo patata	Italiano	-
	Dolique bulbeux, pois patate	Francês	-
	Dòu shǔ, saa got	Chinês	China
	Kuzu-imo	Japonês	Japão
	Bangkoewang	Holandês	-
	Mexikanische yam bohne, knollenbohne, jamsbohne	Alemão	Germânia
	Sakaloo, kesor, aloo	Bangla	Bangladesh
	Sankalu	Hindi	Índia
	Bangkwang, singkwang	Malaio	Malásia
	Chicam	Maya	México
	Catzotl	Nahua	México
	Nupe, nupera	Cumana	Venezuela
Singkamas	Filipino	Filipinas	
Mexicói karalabé	Húngaro	Hungria	
<i>P. tuberosus</i>	Feijão-jacatupé, jacatupé, inhame amazônico, feijão-macuco	Português	Brasil
	Mbakuku	Guarani	Brasil*
	Yaspo	Huitoto	Peru
	Jiquima, jicama	Espanhol	-
	Potato bean, tuberosus yam bean, yam bean	Inglês	-
	Dolique tubéreux, pois tubéreux	Francês	-
	Knollen yams bohne	Alemão	-

Adaptada de Ramos-de-la-Peña *et al.* (2013) e EPPO (2021).

*Bioma Mata Atlântica (Pereira *et al.* 2016).

No Brasil, os registros iniciais do cultivo de *Pachyrhizus* spp. remontam a 1556, na ilha de São Vicente, em São Paulo. Naquela época, o cultivo era destinado à alimentação dos índios e das pessoas escravizadas durante o período colonial (Peckolt 1922). Atualmente, existem 92 registros documentados desse gênero em diversos estados brasileiros, incluindo o Amazonas, Pará, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Piauí, São Paulo e Tocantins (GBIF 2021; SiBBR 2021).

Acredita-se que os índios Guarani tenham introduzido no Bioma Mata Atlântica plantas adaptáveis a diferentes ambientes. Essas plantas eram transportadas de aldeia em aldeia e eram utilizadas tanto como alimento quanto para fins medicinais, como a preparação de xarope para

tratar a tosse (Noelli 1994; Balbin *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2016). Dentre as plantas, destacam-se *Pachyrhizus erosus* e *P. tuberosus*, que eram conhecidos por eles como "mbakuku" (Pereira *et al.* 2016).

2.2 Descrição botânica

Pachyrhizus spp. é uma planta herbácea que pode crescer de forma ereta, semiereta ou espalhada (Zanklan *et al.* 2007; Kim *et al.* 2009). Ela pode ser classificada como trepadeira e é autógama, com taxa de cruzamento entre 2 e 4% (Sørensen 1996). O crescimento da planta pode ser determinado, atingindo cerca de 30 cm de altura, ou indeterminado, podendo alcançar até 5,4 m de altura (Noda *et al.* 1984; Kim *et al.* 2009).

As folhas de *Pachyrhizus* spp. são imparipinadas e podem ser trifoliadas ou unifoliadas. Elas apresentam estipes e estípulas (Phillips-Mora *et al.* 1993; Sørensen 1996) e possuem margens inteiras, podendo ser ligeiramente dentadas (Figura 1A) (Sørensen 1996). As flores da planta podem ser violetas, rosas ou brancas e estão dispostas em racemos axilares, com variação de dois a 16 flores por racemo (Figura 1A) (Sørensen 1996; Kim *et al.* 2009). Elas possuem pedúnculos longos ascendentes, cálice tubular, corola papilionácea e simetria zigomorfa (Noda e Machado 1997; Silva Filho *et al.* 1997).



Figura 1. Planta com flores violetas (A); vagens (B); e sementes (C) de *Pachyrhizus* spp.
Fonte: Costa de Castro 2021 (A); Autora 2021 (B e C).

As vagens de *Pachyrhizus* spp. são alongadas e achatadas entre as sementes (Figura 1B) (Sørensen 1996). Elas podem variar em seu comprimento de 8 a 25,5 cm e em largura de 11 a 23 mm (Sørensen 1996; Reddy 2015). Cada vagem contém de 8 a 11 sementes (Reddy 2015). As sementes têm formas quadradas, ovais ou reniformes, medindo cerca de 10 x 15 mm (Figura 1C) (Sørensen 1996; Kim *et al.* 2009). A cor das sementes varia entre vermelho, verde, roxo, preto e creme com manchas (Sørensen 1996; Kim *et al.* 2009).

As raízes de *Pachyrhizus* spp. são tuberosas e podem ter formatos alongados, arredondados, ovais ou irregulares (Figura 2) (Ascheri *et al.* 2014; Krisnawati *et al.* 2018). A casca das raízes é marrom ou púrpura (Ascheri *et al.* 2014). A polpa das raízes pode ser crocante ou suculenta, com um sabor moderadamente doce (Sørensen 1996; Krisnawati *et al.* 2018), e sua cor pode variar entre branca, creme, amarela ou púrpura (Ascheri *et al.* 2014; Krisnawati *et al.* 2018). A planta pode produzir uma única raiz tuberosa que se estende verticalmente no solo ou várias raízes tuberosas que se espalham lateralmente a partir do caule principal, com dimensões que podem atingir 30 x 25 cm (Phillips-Mora *et al.* 1993; Sørensen 1996).



Figura 2. Diferentes formatos de raízes de *Pachyrhizus* spp.: arredondadas (A, B e C) e alongadas (D, E e F).

Fonte: Autora. Fotos tiradas em 2019 na Estação Experimental do Ariáú em Iranduba, Amazonas.

2.3 Domesticação e melhoramento

O inhame amazônico (*P. tuberosus*) é conhecido desde o período pré-agrícola (12.200-8.500 a.C.) (Léon 2000). Acredita-se que esta espécie seja nativa da região ocidental do Amazonas e que sua domesticação tenha começado nos Andes peruanos durante o período pré-colombiano (Léon 2000). Os índios amazônicos e as aldeias remotas no Peru cultivam essa planta na agricultura itinerante (Sørensen 1996).

Houve relatos na literatura que *P. tuberosus* fosse apenas uma cultivar (cv.) de *P. erosus*, mas essa afirmação foi invalidada por Sørensen (1988) após uma análise detalhada das espécies. Uma década depois, foi confirmado que há uma clara separação no pool genético entre as duas espécies (Estrella *et al.* 1998). Devido ao seu local de domesticação, é provável que o inhame amazônico compartilhe progenitores com a espécie *P. ahipa* (Delêtre *et al.* 2017). Entretanto, durante o Holoceno Médio, o ambiente deve ter influenciado na seleção de ecótipos divergentes (Delêtre *et al.* 2017).

A espécie *P. tuberosus* sofreu adaptações ecofisiológicas que resultaram em um complexo de cultivares, incluindo ‘Ashipa’, ‘Chuin’, ‘Jíquima’ e ‘Yushpe’ (Tapia e Sørensen 2003; Balbin *et al.* 2007; Delêtre *et al.* 2017). Essas cultivares diferem em sua morfologia foliar, ecologia e práticas de cultivo tradicionais (Sørensen *et al.* 1997b). Por exemplo, a cv. Ashipa é geralmente cultivada em terra-firme, enquanto ‘Chuin’ e ‘Yushpe’ são cultivadas em áreas alagadas (várzea) (Balbin *et al.* 2007). A ‘Yushpe’ é encontrada apenas ao longo do rio Ucayali, no Peru (Balbin *et al.* 2007). Apenas ‘Jíquima’ possui crescimento determinado, é monotuberosa e se desenvolve bem em áreas secas e planas da costa do Equador (Sørensen *et al.* 1997b; Delêtre *et al.* 2017).

Dentro das cultivares Ashipa e Chuin, existem subgrupos chamados de raças locais (Tabela 2) (Balbin *et al.* 2007). As raças locais de ‘Chuin’ são divididas em dois grupos: os Pitichuin e os Cocotichuin (Tabela 2) (Balbin *et al.* 2005; Balbin *et al.* 2007). O grupo Pitichuin possui teores elevados de matéria seca em comparação com o restante do complexo e com as espécies (~36%) (Grüneberg *et al.* 2003; Balbin *et al.* 2007).

Tabela 2. Grupos e raças das cultivares de *Pachyrhizus tuberosus*.

Cultivar	Grupo	Raça	Distribuição
Ashipa	-	Ashipa branca	Bacia Amazônica
	-	Ashipa amarela	
	-	San Martín	
Chuin	Pitichuin	Pitichuin branco	Amazônia Peruana
		Pitichuin amarelo	
	Pitichuin roxo (morado)		
	Cocotichuin	Cocotichuin amarelo	
		Cocotichuin roxo (morado)	

O cultivo do inhame mexicano (*P. erosus*) já tinha grande importância para a civilização maia nos períodos pré e pós-colombianos (1.800 a.C.) (Léon 2000). A espécie também era cultivada pelas civilizações toltecas, olmecas, astecas e zapotecas (Urbina 1906; Martínez 1979). O cultivo se estendeu para Filipinas e, em seguida, para a Ásia e Oceania (Léon 2000) e pode ser encontrada fora de sua distribuição original (Ørting *et al.* 1996). Vem sendo amplamente cultivado na Índia, México, China, Cingapura, Filipinas, Havaí e Indonésia (Reddy 2015).

O inhame mexicano é a única espécie que desenvolveu cultivares estáveis de alto rendimento por seleção de linhagens puras (Sørensen 1996). Possui um complexo contendo duas variedades que se diferem pela sua região de origem e morfologia: a variedade *erosus* de

origem mexicana e a variedade *palmatilobus* de origem centro-americana (Sørensen 1996). Seleções de vários materiais crioulos resultaram nas cultivares: ‘Agua Dulce’, ‘Cristalina’, ‘San Juan’, ‘San Miguelito’ e ‘Vega de San Juan’ (Heredia 1994).

A espécie *P. ahipa* é de grande interesse para cruzamentos com *P. erosus*, pois há ausência de material ancestral selvagem conhecido, possui grande adaptabilidade ao clima, hábito de crescimento ereto e ciclo curto (cinco meses) (Sørensen *et al.* 1997a). Em contrapartida, Brücher (1989) afirma que *P. ahipa* foi selecionado de materiais selvagens que foram cultivados na área de transição da floresta para os Andes, no Peru. Os primeiros indícios de *P. ahipa* na América do Sul foram resíduos de plantas encontrados em feixes de múmias da Necrópole de Paracas (cerca de 10.000 anos atrás), pertencentes à cultura nazca da costa sul peruana (Figura 3) (Léon 2000).



Figura 3. Gravuras de *Pachyrhizus ahipa* na cultura nazca. Fonte: Yacovleff 1933.

A dificuldade na identificação de *P. ahipa* originou-se de seleções equivocadas e do cultivo limitado da cultura (Sørensen 1996). Algumas seleções partiram da afirmação de que *P. ahipa* produz apenas uma raiz tuberosa por planta, entretanto *P. erosus* e *P. tuberosus* cv. Jíquima também podem produzir apenas uma raiz (Sørensen 1996; Sørensen *et al.* 1997b).

O cultivo de *P. ahipa* está centralizado no norte da Argentina e nos vales subtropicais do leste do Andes da Bolívia (1.000 a 3.000 metros acima do nível do mar) (Sørensen *et al.* 1997a; Sørensen *et al.* 1997b). Enquanto *P. erosus* e *P. tuberosus* foram selecionadas para ambos os ambientes: áreas altas e secas, e áreas baixas e alagáveis (Sørensen *et al.* 1997a; Sørensen *et al.* 1997b; Balbin *et al.* 2007).

A espécie *P. ahipa* é a única que não possui um estudo sobre sua diversidade genética (Zanklan *et al.* 2018), e suas duas variedades foram classificadas pelo seu hábito de crescimento: determinado e indeterminado (Ørting *et al.* 1996). Para avanços em programas de melhoramento com esta espécie, é necessário conhecer os parâmetros genéticos para as características desejáveis (Roychowdhury *et al.* 2012; Zanklan *et al.* 2018). Segundo Zanklan *et al.* (2018), o melhoramento de *Pachyrhizus* spp. para a produção de raízes visa: 1) a ampla adaptação e o alto rendimento de *P. erosus*; 2) o elevado teor de matéria seca de *P. tuberosus* cv. Chuin; e 3) o hábito de crescimento de *P. ahipa*.

Agaba *et al.* (2021) hibridizaram as três espécies de *Pachyrhizus* visando as características de interesse citadas por Zanklan *et al.* (2018). Os resultados mostraram que há variabilidade genética e fenotípica entre as famílias selecionadas dos cruzamentos entre as espécies (Agaba *et al.* 2021). Para os ganhos genéticos, recomenda-se a hibridização e a seleção recorrente (Zanklan *et al.* 2018; Agaba *et al.* 2021). Também, aconselha-se evitar cruzamentos intrafamiliares (Agaba *et al.* 2021).

Os cruzamentos interespecíficos entre as três espécies resultam em híbridos férteis, com exceção de *P. ahipa* x *P. tuberosus* cv. Ashipa (Agaba *et al.* 2017). Experimentos de hibridização das espécies selvagens com as cultiváveis mostraram que somente *P. panamensis* demonstrou ser compatível com as três espécies (Grum 1994). Com *P. ferrugineus*, apenas na combinação *P. ferrugineus* x *P. erosus* produziu sementes (Sørensen 1996).

Em seleções de *Pachyrhizus* spp., são considerados principalmente o rendimento de suas raízes (Agaba *et al.* 2017; Zanklan *et al.* 2018; Agaba *et al.* 2021). Experimentos que visam a seleção pela toxicidade das sementes de *Pachyrhizus* spp. são escassos (Lautié *et al.* 2013b; De Lima *et al.* 2021). É necessário um programa de melhoramento para a seleção de progênies pela toxicidade e produtividade de grãos (Grünemberg 1999; De Lima *et al.* 2021).

2.4 Cultivo e produtividade

Enquanto espécies tradicionais de cultivo alimentício, como a batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) e o cará (*Dioscorea bulbifera* L.), são propagadas vegetativamente por suas raízes, o se diferencia ao ser uma leguminosa que se propaga por meio de sementes, o que simplifica o processo de plantio (Balbin *et al.* 2007). Apesar de ser cultivado como uma cultura anual, o feijão-macuco apresenta um hábito perene (Sørensen 1996), gerando raízes tuberosas que podem ser colhidas entre quatro a oito meses após a semeadura (Balbin *et al.* 2005; Ramos-

de-la-Peña *et al.* 2013), com a produção de sementes ocorrendo aproximadamente seis meses após o plantio (Balbin *et al.* 2005).

Essa planta é tolerante a solos ácidos e distróficos (Silva *et al.* 2016). O plantio pode ser realizado diretamente no solo, com a semeadura de duas a cinco sementes em covas com aproximadamente dois a três centímetros de profundidade (Sørensen 1996). Em áreas com alta pluviosidade, é recomendável o plantio em leiras para melhorar a drenagem (Figura 4) (Sørensen 1996). Antes de semear, é aconselhável imergir as sementes em água por um período de 12 horas para o estimular a germinação (Reddy 2015). As sementes normalmente germinam em cerca de duas semanas após semeadura (Reddy 2015).



Figura 4. Preparo de leiras para plantio de *Pachyrhizus* spp.
Fonte: Brasil. Fotos tiradas em 2020 na Estação Experimental de Irrigação Localizada em Hortaliças do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM-Campus Leste) em Manaus, Amazonas.

Para a produção de raízes, o espaçamento recomendado é de 0,60 a 1 metro entre plantas e de 1 a 2 metros entre leiras (Balbin *et al.* 2005; Huachua e Chávez 2014). Em consórcios com outras espécies, é aconselhável manter um espaçamento maior de 1,50 metros tanto entre plantas quanto entre leiras (Balbin *et al.* 2005). Além disso, é importante observar que as plantas requerem um período de exposição à luz de 11 a 13 horas diárias para o desenvolvimento adequado das raízes (Reddy 2015).

No que diz respeito à produção de sementes, é recomendado um espaçamento de 1,0 metro entre plantas e 1,50 metros entre leiras (Balbin *et al.* 2005). Após cerca de 15 a 20 dias após a emergência das plantas, cada uma delas deve ser conduzida por dois tutores, cada um com aproximadamente três metros de altura, dispostos de forma a se cruzarem e formarem um 'X' (Figura 5) (Balbin *et al.* 2005). O tutoramento desempenha um papel crucial, promovendo uma melhor distribuição e orientação das folhas, estimulando o crescimento do caule e

aprimorando o desenvolvimento foliar (Melo e Bueno 2000). Estudos mostram que, após 160 dias do plantio, o tutoramento aumenta a matéria seca da parte aérea em 50% e a massa do caule em 40% (Melo e Bueno 2000). No entanto, é importante destacar que o tutoramento pode ser dispensado quando o foco do cultivo está na produção das raízes (Balbin *et al.* 2005).



Figura 5. Tutoramento em plantio de *Pachyrhizus* spp.
Fonte: Balbin *et al.* 2005.

Essa planta é uma leguminosa que possui a capacidade de fixar nitrogênio no solo, contribuindo com uma quantidade significativa desse elemento ($74\text{--}203\text{ kg ha}^{-1}$) (Badillo e Castellanos 1998). Devido a essa característica, ela pode ser incorporada em sistemas de rotação de culturas (Castellanos-Ramos *et al.* 2009), aproveitando sua eficiente relação simbiótica com rizóbios (Stamford *et al.* 2004). Isso possibilita o cultivo da planta sem a necessidade de adição de fertilizantes nitrogenados (Castellanos *et al.* 1997). Vale destacar que o *Pachyrhizus erosus* demonstra ser mais eficiente na fixação de nitrogênio em comparação com o *P. ahipa*, fixando $162\text{--}215$ e $58\text{--}80\text{ kg N ha}^{-1}$, respectivamente (Castellanos *et al.* 1997).

A cultura do feijão-macuco é sensível ao teor de fósforo (P) no solo devido à sua produção de amido nas raízes, e a baixa disponibilidade de fósforo pode limitar o crescimento das plantas (Stamford *et al.* 1999). Recomenda-se a fertilização com fósforo na faixa de $20\text{--}64\text{ kg ha}^{-1}$ de P_2O_5 para aumentar a produção de matéria seca na parte aérea (Stamford *et al.* 1999). Em solos ácidos, é aconselhável também a adição de potássio (K) e magnésio (Mg) a partir de 40 e 20 kg ha^{-1} , respectivamente ($\text{K}_2\text{O}:\text{MgO}$) (Stamford *et al.* 1999). Em solos de terra firme, é recomendada a aplicação de matéria orgânica, como esterco de galinha, na dose de 10 a 20 t ha^{-1} (Huachua e Chávez 2014). A capina em ambientes de terra firme é recomendada em intervalos de 30 dias. A capina é necessária em ambientes de terra firme e deve ser realizada em intervalos de 30 dias. Na várzea, após a retirada da água e exposição do solo, a primeira capina é realizada após 60 dias, seguida de uma segunda após 100 dias da semeadura (Balbin *et al.* 2005).

Para promover a produção de raízes, é recomendada a poda reprodutiva ou vegetativa (Sørensen 1996). A primeira poda deve ser feita aproximadamente dois meses após a semeadura, e pode consistir na retirada de toda a parte vegetativa, de um terço dela ou apenas das flores (Sørensen 1996). Essa prática redireciona os recursos da planta, fazendo com que as raízes se tornem o principal dreno metabólico (Melo e Bueno 2000). Os nutrientes que normalmente seriam alocados para as flores, vagens e sementes passam a ser direcionados para as raízes, o que resulta em um aumento na produção (Melo e Bueno 2000). A combinação da poda reprodutiva com o tutoramento pode aumentar a produção de raízes em até 4,6 vezes (Melo e Bueno 2000). A ausência dessa poda pode reduzir pela metade a produtividade (Balbin *et al.* 2005; Zanklan *et al.* 2007).

A presença de folhas secas em toda a planta e rachaduras no solo ao redor do colo são indicadores de raízes bem desenvolvidas (Balbin *et al.* 2005). A colheita pode ser feita manualmente ou com o uso de enxadas. Para garantir melhor qualidade, as raízes devem ser retiradas antes do amadurecimento das sementes (Sørensen 1996), enquanto as sementes são colhidas manualmente quando as vagens estão secas (Balbin *et al.* 2005). É importante observar que, após a colheita das raízes e das vagens, a espécie *P. tuberosus* pode ter sua parte vegetativa replantada para a produção de novas sementes, embora não haja produção de raízes nesse caso (Sørensen 1996).

Em períodos de alta temperatura e baixa precipitação, é recomendado desfolhar a planta em até 25%, principalmente as folhas velhas (Balbin *et al.* 2005). O estresse hídrico pode reduzir o rendimento de raízes frescas em até três vezes e a produtividade de sementes em até cinco vezes (Zanklan *et al.* 2007). No entanto, é importante ressaltar que, dependendo da espécie, a irrigação pode afetar negativamente a produtividade de matéria seca (Zanklan *et al.* 2007).

O armazenamento das raízes pode ser realizado por até 30 dias em ambientes frescos e escuros, enquanto as sementes devem ser armazenadas em recipientes herméticos e mantidas em câmara fria (Balbin *et al.* 2005; Huachua e Chávez 2014). É importante notar que o armazenamento das sementes por mais de um ano pode reduzir a taxa de germinação (Balbin *et al.* 2005).

O rendimento de raízes frescas pode atingir até 125,9 t ha⁻¹ (Nielsen *et al.* 2000). Em Tonga, a produtividade variou de 24,8 a 51,5 t ha⁻¹ em acessos selvagens (Nielsen *et al.* 2000). No Brasil, o rendimento das raízes em terra firme variou de 3 a 33 t ha⁻¹ entre 64 acessos de *Pachyrhizus* spp. (Vasconcelos *et al.* 2018). Quanto à produtividade de sementes, esta pode

chegar a 5,66 t ha⁻¹ (Zanklan *et al.* 2007). No México e em Tonga, foram registrados rendimentos de apenas 0,6 e 1 t ha⁻¹, respectivamente (Sørensen 1996). Na Tailândia, o rendimento das variedades locais é de 0,72 a 0,84 t ha⁻¹ (Sørensen 1996), e o peso de 1000 sementes pode variar de 180 a 377 g (Grüneberg *et al.* 1999; Zanklan *et al.* 2007).

2.5 Principais doenças e pragas

No armazenamento, as sementes podem ser suscetíveis a ataques de gorgulhos do feijão, como *Araecerus fasciculatus* DeGeer e *Acanthoscelides obtectus* Say (Reddy 2015). Esses insetos são conhecidos por danificar sementes de leguminosas que possuem propriedades tóxicas (Reddy 2015). Eles se desenvolvem dentro da semente e emergem como adultos, deixando um orifício característico (Balbin *et al.* 2005). Os gorgulhos têm a capacidade de destruir até 80% das sementes armazenadas, sendo particularmente prejudiciais em *P. tuberosus* (Reddy 2015). Para o controle desses insetos, é aconselhável secar as sementes ao sol por duas horas e armazená-las em recipientes herméticos de vidro escuro, protegidos da luz (Balbin *et al.* 2005).

As vaquinhas (*Diabrotica* spp. e *Cerotoma* spp.), também conhecidas como broca-das-folhas, podem atacar e danificar as folhas de *Pachyrhizus* spp. (Figura 6) (Sørensen 1990; EPPO 2021). Esses besouros têm o potencial de reduzir a área foliar, afetando conseqüentemente a taxa fotossintética das plantas (Moscardi *et al.* 2012). Para controlar essas pragas, são adotadas medidas como a rotação de culturas, o cultivo consorciado e o uso de inseticidas (Huachua e Chávez 2014).



Figura 6. *Cerotoma* spp. em folha de *Pachyrhizus* spp.
Fonte: Autora. Foto tirada em 2018 na Estação Experimental do Ariaú em Iranduba, Amazonas.

A broca-das-vagens (*Maruca vitrata* Fabricius) é considerada uma das principais pragas das leguminosas tropicais (Reddy 2015; Mahalle *et al.* 2019). As mariposas e suas larvas, que têm hábitos noturnos, costumam perfurar as flores e vagens das plantas de *Pachyrhizus* spp. (Reddy 2015; Mahalle *et al.* 2019). Cada larva pode danificar de quatro a seis flores (Mahalle *et al.* 2019). A infestação por essas pragas ocorre aproximadamente 21 dias após o plantio, podendo causar danos que variam de 20% a 80% na produção (Reddy 2015; Mahalle *et al.* 2019). O controle das larvas pode ser efetuado utilizando inseticidas contendo clorantianiliprole, espinosade, flubendiamida, indoxacarbe ou tiodicarbe (Mahalle *et al.* 2019). Como medida preventiva no controle da broca e de nematoides, pode-se aplicar uma solução de fertilizante foliar e inseticida, como o Oncol (1 litro por hectare) (Gruneberg 2016).

Além disso, a cultura do feijão-macuco é suscetível a diversas outras pragas, como a cigarrinha-verde (*Empoasca dolichi* Paoli), moscas-branca (*Aleurothrixus* spp., *Aleurotrachelus* spp. e *Bemisia* spp.), lagarta-das-vagens (*Michaelus jebus* Godart), cochonilhas (*Ferrisia virgata* Cockerell) e tripes (*Frankliniella occidentalis* Pergande) (Sørensen 1990). As cochonilhas geralmente são encontradas em ambientes de cultivo protegido, como casas de vegetação (Sørensen 1990). Os tripes podem causar o aborto dos botões florais (Sørensen 1990).

Nematoides também podem ser encontrados ocasionalmente nas raízes de *Pachyrhizus* spp. (Tabela 3) (Duke 1981; Balbin *et al.* 2005) e, quando presentes, podem representar um problema para a produção local (Reddy 2015). Esses nematoides tendem a preferir solos arenosos (Galbieri *et al.* 2015) e afetam principalmente a espécie *P. tuberosus* (Reddy 2015). Os sintomas incluem a formação de galhas no sistema radicular e "verrugas" que afetam a produção das raízes, conferindo-lhes um sabor amargo (Sørensen 1997a; Galbieri *et al.* 2015). Para o controle desses nematoides, é aconselhável usar sementes saudáveis, implementar a rotação de culturas, praticar o plantio consorciado, controlar plantas daninhas e empregar nematicidas (Huachua e Chávez 2014; Galbieri *et al.* 2015).

Tabela 3. Nematoides relatados em raízes de *Pachyrhizus* spp.

Nematoides (Nome científico)	Nome comum
<i>Heterodera glycines</i> Ichinohe	Nematoide de cisto da soja
<i>Heterodera schachtii</i> A.Schmidt	Nematoide de cisto da beterraba
<i>Meloidogyne arenaria</i> (Neal) Chitwood	Meloidoginose
<i>Meloidogyne hapla</i> Chitw.	Meloidoginose ou nematoide das galhas do Norte
<i>Meloidogyne incógnita</i> (Kofold & White) Chitw.	Nematoide das galhas
<i>Meloidogyne javanica</i> (Treub) Chitw.	Nematoide das galhas do javanês ou da cana-de-açúcar
<i>Pratylenchus penetrans</i> (Cobb) Filipjev & Schuurmans-Stekhoven	Nematoide das lesões

Entre os principais agentes fúngicos de *Pachyrhizus* (conforme mostrado na Tabela 4), destaca-se o responsável pela ferrugem asiática, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P.Syd. Esse fungo causa lesões e manchas marrons nas folhas e vagens, principalmente em *P. erosus* e em *P. tuberosus* (Delaney *et al.* 2011; EPPO 2021). Durante a colheita, existe a possibilidade de ferir os tubérculos com enxadas, criando condições propícias para a proliferação de fungos como *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. (Sørensen 1996). No Amazonas, Melo e Bueno (2000) detectaram *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P.Syd. em 100% das plantas, além de *Colletotrichum* sp. em folhas e vagens, e a murcha causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc.

A maioria das doenças fúngicas que afetam os feijões é transmitida por sementes infectadas (Wenland *et al.* 2018), incluindo doenças como mancha de alternária, antracnose, murcha de fusário, podridão cinzenta da haste, podridão radicular, mofo branco e podridão do colo (Tabela 4) (Wenland *et al.* 2018). Para controlar doenças fúngicas durante o cultivo, é recomendável utilizar sementes saudáveis, praticar a rotação de culturas e aplicar fungicidas quando necessário (Sørensen 1997a; Wenland *et al.* 2018).

Tabela 4. Fungos que atacam *Pachyrhizus* spp.

Patógeno	Doença	Parte da planta afetada	Ref.*
<i>Aphanomyces euteiches</i> Drechsler	Podridão da raiz do feijão	Raiz	1
<i>Ascochyta boltshauseri</i> Saac.	Mancha de ascochita	Folhas, hastes, vagens e sementes	1
<i>Ascochyta phaseolorum</i> Saac.	Mancha de ascochita	Folhas, hastes e vagens	1
<i>Alternaria dauci</i> (JGKühn) JWGroves & Skolko	Mancha de alternária	Folhas	1
<i>Botrytis cinérea</i> Pers.	Mofo cinzento	Flores, vagens e sementes	1
<i>Cercospora canescens</i> Ellis & G.Martin	Mancha de cercospora	Folhas	6
<i>Cercospora cruenta</i> Saac.	Mancha de cercospora	Folhas	1
<i>Cladosporium</i> sp.	Cladosporiose	Raiz	3
<i>Chaetoseptoria wellmanii</i> JAStev.	Mancha marrom da folha	Folhas	6
<i>Colletotrichum</i> spp.	Antracnose	Folhas, hastes, vagens e sementes	2, 6
<i>C. lindemuthianum</i> (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara	Antracnose	Folhas, hastes, vagens e sementes	1
<i>C. truncatum</i> (Schwein.) Andrus & WDMoore	Sarna	Folhas, hastes e vagens	6
<i>Erysiphe</i> spp. (<i>Oidium</i> spp.)	Oídio	Folhas	6
<i>Erysiphe cruciferarum</i> Opiz	Oídio da Brassica	Folhas e hastes	6
<i>Erysiphe polygoni</i> DC.	Oídio da beterraba	Folhas e hastes	1, 6
<i>Erysiphe taurica</i> Lévl.	Oídio	Folhas e hastes	6
<i>Fusarium acuminatum</i> Ellis & Everhart	Podridão radicular	Raízes primárias	1
<i>Fusarium culmorum</i> (Wm.G.Sm.) Sacc.	Podridão radicular	Raízes primárias	1
<i>Fusarium oxyporum</i> Schltdl.	Podridão radicular	Raízes primárias	1
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	Podridão radicular seca	Raízes primárias	1
<i>Macrophomina</i> spp.	Podridão radicular	Raízes primárias	6
<i>Macrophomina faseolina</i> (Tassi) Goid.	Podridão cinzenta da haste	Raízes primárias e hastes	1
<i>Pseudocercospora griseola</i> (Sacc.) Crous & U.Braun	Mancha angular	Folhas e hastes	6
<i>Phakopsora pachyrhizi</i> Syd. & P.Syd.	Ferrugem asiática	Folhas e vagens	4, 5, 6
<i>Pleospora herbarum</i> (Pers.) Rabenh	Mancha cinzenta da folha	Folhas	1
<i>Pythium</i> spp.	Podridão radicular	Raízes primárias	6
<i>Pythium aphanidermatum</i> (Edson) Fitzp.	Podridão radicular	Raízes primárias	6
<i>Phytophthora</i> spp.	Míldio	Raízes, folhas, vagens e hastes	6
<i>Rhizoctonia solani</i> J.G.Kühn	Podridão radicular	Raiz, folhas, vagens, sementes e hastes	1
<i>Rhizopus</i> sp.	Podridão-mole	Raiz	6
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	Podridão-mole	Raiz	3
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	Mofo branco	Raiz, folhas e hastes	1
<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	Podridão do colo	Raiz, folhas e hastes	1, 4
<i>Uromyces appendiculatus</i> (Pers.) Unger	Ferrugem do feijão	Folhas, vagens e hastes	1

*Referências: ¹Duke (1981); ²Sørensen (1990); ³Sørensen (1996); ⁴Melo e Bueno (2000); ⁵Delaney *et al.* (2011); ⁶Reddy (2015).

Dentro das bactérias, as espécies pertencentes ao gênero *Erwinia* podem sistematicamente infectar tanto as raízes no campo quanto as armazenadas (Sørensen 1990). Também foram relatados casos de crestamento bacteriano nas folhas, hastes, vagens e sementes causados por bactérias como *Xanthomonas phaseoli* Smith, *Pseudomonas savastanoi* (Smith) Janse e *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Gardan *et al.* (Birch *et al.* 1981; Duke 1981; Trindade *et al.* 2003). Para controlar essas infecções, recomenda-se o uso de sementes saudáveis durante o plantio e a aplicação de produtos à base de cobre (Duke 1981; Trindade *et al.* 2003).

Além disso, o feijão-macuco também pode ser afetado pelo vírus do mosaico comum do feijão, conhecido como *Bean common mosaic virus* (BCMV) em inglês, que é transmitido por pulgões, incluindo *Aphis craccivora* Koch, *A. gossypii* Glover e *A. glycines* Matsumura (Damayanti *et al.* 2008). Os sintomas dessa infecção incluem faixas de nervuras verdes nas folhas e má formação foliar, o que pode resultar na redução do rendimento das plantas em até 20-100% (Damayanti *et al.* 2008). É importante remover as plantas infectadas, pois elas podem transmitir o vírus para as sementes (Damayanti *et al.* 2008).

2.6 Composição química das raízes

As raízes tuberosas de *Pachyrhizus* spp. são notáveis por suas características nutricionais. Elas contêm, em média, cerca de 20% de matéria seca (Agaba *et al.* 2017) e são ricas em amido, representando de 21,7% a 68,7% na base seca (b.s.) (Ramos-de-la-Peña *et al.* 2013; Santayana *et al.* 2014). Em comparação com outras espécies de *Pachyrhizus*, as raízes de *P. ahipa* destacam-se por possuírem amido com grânulos homogêneos, o que lhes confere potencial na indústria de papel (Leonel 2007).

Além disso, essas raízes apresentam teores de proteínas que variam de 9% a 32% na base seca (b.s.) (Zanklan *et al.* 2007; Kisambira *et al.* 2015), o que é maior do que os encontrados na mandioca, por exemplo, que possui cerca de 6,42% de proteínas (Ceballos *et al.* 2006). A goma de tapioca produzida a partir desta raiz, conhecida como "gari" na África, possui cinco vezes mais proteínas do que a tapioca de mandioca, com um teor de cerca de 1% (Zanklan *et al.* 2007).

As raízes também são uma fonte de fibra dietética, com teores totais variando de 8 g a 15 g por 100 g na base seca (b.s.) (Zanklan *et al.* 2007; Kisambira *et al.* 2015). Além disso, elas contêm uma quantidade significativa de gordura, com um teor de 25,58 g por 100 g na base seca (b.s.) e um valor calórico de 39% na base úmida (b.u.) (Noman *et al.* 2007; Kisambira *et al.* 2015).

Essas raízes são ricas em minerais, como ferro (10,44 mg por 100 g) (Leterme *et al.* 2006) e o sódio (35 mg por 100 g) (Noman *et al.* 2007). Elas também são fontes de aminoácidos, incluindo ácido glutâmico, glicina e histidina, com teores de 13,6, 4,15 e 2,58 $\mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente (Noman *et al.* 2007). Além disso, contêm sacarose (3,29% a 4,61%), glicose (3,13% a 5,77%) e frutose (3,53% a 6,75%) (Zanklan *et al.* 2007) e são fontes de vitaminas do complexo B, como B1, B2, B3 e B6, com destaque para a vitamina C, que pode chegar a 14 mg por 100 g (Noman *et al.* 2007).

No entanto, é importante mencionar que as raízes também contêm alguns antinutrientes, embora em teores mínimos que não prejudicam a absorção de nutrientes essenciais. Estes incluem ácido fítico, fítico-fósforo e ácido tânico, totalizando 0,010 mg por 100 g (Noman *et al.* 2007). Além disso, as raízes contêm lectina e cianeto de hidrogênio, com teores de 0,0003 e 0,0032 mg por 100 g, respectivamente (Noman *et al.* 2007).

2.7 Uso das raízes

A raiz do feijão-macuco é incrivelmente versátil em sua aplicação culinária. Ela pode ser consumida de várias maneiras, incluindo crua, frita, em saladas, sopas e até mesmo conservada em vinagre com cebola e pimenta. Além disso, é utilizada no preparo de massas, na panificação e pode ser usada na produção de xaropes e bebidas alcoólicas (Fernandez *et al.* 1997; Ramos-de-la-Peña *et al.* 2013; Adegbola *et al.* 2015).

É importante destacar que a raiz do feijão-macuco desempenha um papel fundamental na nutrição de muitas comunidades na África Ocidental. Ela faz parte da dieta diária de aproximadamente 80% da população da Nigéria, Togo, Benin e Gana, onde é comumente usada na forma de goma de tapioca, conhecida como "gari" (Zanklan *et al.* 2007; Hounyèvou *et al.* 2013).

Além de seu valor nutricional, as raízes do feijão-macuco também têm sido exploradas por seus benefícios além da alimentação. Na Indonésia, elas são tradicionalmente utilizadas como cosméticos para clarear a pele e têm sido associadas a propriedades protetoras contra o sol (Lukitaningsih e Holzgrabe 2014; Lukitaningsih e Holzgrabe 2019). Além disso, estudos em ratos ovariectomizados demonstraram que essas raízes possuem potencial terapêutico na pós-menopausa e podem ajudar na prevenção da osteoporose (Nurrochmad *et al.* 2010).

2.8 Composição das sementes

As sementes secas naturalmente possuem, em média, uma elevada concentração de matéria seca, representando cerca de 95% do seu peso total (Kisambira *et al.* 2015). Além disso, essas sementes são ricas em proteínas, com teores variando entre 23% e 34%, bem como em óleo, com concentrações entre 20% e 28% (Grüneberg *et al.* 1999). Elas também contêm carboidratos, com uma faixa de 24,1 a 26,85 g a cada 100 g de sementes (Santos *et al.* 1996; Kisambira *et al.* 2015), e são fontes de fibra bruta (7,5–8,1 g por 100 g) e cinzas (3,4–4,1 g por 100 g) (Kisambira *et al.* 2015).

As sementes de feijão-macuco são igualmente ricas em minerais essenciais para a saúde, com teores expressos em mg por 100 g, incluindo cálcio (356,0), ferro (16,0), potássio (992,0), sódio (6,8), zinco (4,0) e fósforo (286,0) (Santos *et al.* 1996). Um fato notável é que uma única porção média de feijão-macuco cozido, com cerca de 100 g, pode fornecer a ingestão diária recomendada de ferro para um ser humano (MSD 2021).

O óleo extraído das sementes do feijão-macuco é notável por sua alta concentração de ácidos graxos e vitamina E, que inclui quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis (Grüneberg *et al.* 1999). O teor de γ -tocoferol presente no óleo (249,3–896,2 mg kg⁻¹) é particularmente superior ao encontrado em óleos de oliva, canola e soja, que contêm 15,15, 390,24 e 642,73 mg kg⁻¹, respectivamente (Grüneberg *et al.* 1999; Guinaz *et al.* 2009). A combinação desses altos teores de óleo, proteína, ácido palmítico (29,3%) e γ -tocoferol torna as sementes do feijão-macuco de grande interesse para a indústria de alimentos (Grüneberg *et al.* 1999).

Além de suas características nutricionais positivas, as sementes do feijão-macuco possuem baixos níveis de antinutrientes, o que as torna favoráveis para a digestibilidade das proteínas e a absorção de vitaminas e minerais essenciais (Santos *et al.* 1996; Monteiro *et al.* 2005). No entanto, vale ressaltar que essas sementes contêm compostos flavonoides, principalmente isoflavonoides, que podem ser tóxicos, tornando-as impróprias para o consumo (Tabela 5) (Scramin 1994; Béjar *et al.* 2000; Leuner *et al.* 2013). Portanto, a presença desses compostos deve ser levada em consideração ao considerar o uso das sementes do feijão-macuco na alimentação humana.

Tabela 5. Compostos tóxicos isolados das sementes de *Pachyrhizus* spp.

Composto	Classificação	Espécie de <i>Pachyrhizus</i>	Referência*
Desidroneotenona	Isoflavona	<i>P. ahipa</i> , <i>P. erosus</i> , <i>P. ferrugineus</i> e <i>P. panamensis</i>	1, 2, 3, 4
Desidropachyrhizona	Isoflavona rotenoide	<i>P. erosus</i>	2
3,9-Dihidroipterocarpano	Isoflavona pterocarpano	<i>P. erosus</i>	2
Dolineona	Isoflavona rotenoide	<i>P. ahipa</i> , <i>P. erosus</i> , <i>P. ferrugineus</i> e <i>P. panamensis</i>	1, 2, 3, 4
Erosenona	Isoflavona	<i>P. erosus</i>	2
Erosinina	Flavona	<i>P. erosus</i>	2
Erosona	Isoflavona rotenoide	<i>P. ahipa</i> , <i>P. erosus</i> , <i>P. ferrugineus</i> e <i>P. tuberosus</i>	1, 2, 4, 7
Genisteína	Isoflavona	<i>P. tuberosus</i>	5
4-Didroxiiisocordoína (=isobavachalcone)	Chalcona	<i>P. ahipa</i>	1
12a-Didroxierosona	Isoflavona rotenoide	<i>P. erosus</i> , <i>P. panamensis</i> e <i>P. tuberosus</i>	1, 2, 7
12a-Didroxidolineona	Isoflavona rotenoide	<i>P. ahipa</i> , <i>P. erosus</i> , <i>P. ferrugineus</i> e <i>P. tuberosus</i>	1, 3, 7
12a-Didroximunduserona	Isoflavona rotenoide	<i>P. erosus</i>	2
12a-Didroxipaquirrizona	Isoflavona rotenoide	<i>P. erosus</i>	2, 3
12a-Didroxirrottenona	Isoflavona rotenoide	<i>P. ahipa</i> , <i>P. erosus</i> , <i>P. ferrugineus</i> , <i>P. panamensis</i> e <i>P. tuberosus</i>	1, 2, 3, 7
Neodunol	Isoflavona pterocarpano	<i>P. erosus</i>	2
Neotenona	Isoflavanona	<i>P. ahipa</i> , <i>P. erosus</i> , <i>P. ferrugineus</i> , <i>P. panamensis</i> e <i>P. tuberosus</i>	1, 2, 3, 7
Paquirrizina (=fenilfuranocumarina)	Isoflavona	<i>P. ahipa</i> , <i>P. erosus</i> , <i>P. ferrugineus</i> e <i>P. tuberosus</i>	1, 2, 3, 4, 7
Derivado da paquirrizina	Isoflaveno	<i>P. tuberosus</i>	1
Paquirrizona	Isoflavona rotenoide	<i>P. ahipa</i> , <i>P. erosus</i> , <i>P. ferrugineus</i> e <i>P. panamensis</i>	1, 2, 3, 4
Rotenona	Isoflavona rotenoide	<i>P. ahipa</i> , <i>P. erosus</i> , <i>P. ferrugineus</i> , <i>P. panamensis</i> e <i>P. tuberosus</i>	1, 2, 4, 6, 7
Tetrametoxiisoflavona	Isoflavona	<i>P. panamensis</i>	1

*¹Scramin (1994); ²Béjar *et al.* (2000); ³Phrutivorapongkul *et al.* (2002); ⁴Barrera-Necha *et al.* (2004); ⁵Sklenickov *et al.* (2009); ⁶Lautié *et al.* (2012); ⁷Leuner *et al.* (2013).

Os flavonoides são compostos fenólicos que pertencem aos metabólitos secundários (Lopes *et al.* 2010). Essas substâncias podem ser divididas em oito subclasses, a saber: antocianidinas, dihidroflavanas, flavandiois, flavanois, flavanonas, flavonas, flavonois e isoflavonoides (Carvalho *et al.* 2020). No contexto das plantas da subfamília Faboideae, à qual o gênero *Pachyrhizus* pertence, os isoflavonoides são particularmente relevantes, pois são conhecidos por conter substâncias farmacologicamente ativas (Carvalho *et al.* 2020). Esta subclasse pode ser subdividida em várias categorias, incluindo isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanas, isoflavanois, rotenoides, pterocarpanos e cumestanos (Carvalho *et al.* 2020).

Dentre essas subdivisões, os rotenoides têm uma notável ação inseticida e ictiotóxica (Carvalho *et al.* 2020). A rotenona é o principal constituinte ativo deste grupo e é conhecida por sua atuação como um inseticida fitogênico (PubChem 2021).

2.9 Uso das sementes

Vários testes foram realizados para comprovar a eficácia dos extratos tóxicos de sementes de feijão-macuco no controle de pragas. Por exemplo, extratos preparados a partir de sementes de *Pachyrhizus erosus* com enxofre molhável (1:10 p:v) demonstraram eficácia de até 100% no controle de piolhos bovinos *Bovicola bovis* L., *Linognathus vituli* L. e *Solenopotes capillatus* Enderlein (Matthysse e Schwardt 1943).

O estudo conduzido por Béjar *et al.* (2000) revelou que a variedade Agua Dulce de *P. erosus* possui propriedades inseticidas contra o gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais* Motschulsky & V.de). Esses autores incorporaram seis compostos isolados das sementes na concentração de 1% na dieta artificial dos insetos. As dietas contendo rotenona, erosona, paquirrizina e paquirrizona resultaram em rejeição alimentar (44–88%), levando a uma baixa taxa de mortalidade (2–22%).

Basukriad e Wilkins (2014) conduziram testes utilizando sementes de *P. erosus* para avaliar o efeito sobre a oviposição de traças-das-crucíferas (*Plutella xylostella* L.). Os pesquisadores disponibilizaram folhas de couve tratadas com extratos de sementes de *P. erosus*, bem como raízes de *Lonchocarpus* sp., rotenona, cumarina e rutina, todos na concentração de 0,5%, para os adultos dessas traças. Os resultados revelaram que o extrato de sementes de *P. erosus* reduziu a oviposição em folhas tratadas em até 55%.

Em Kalyani, na Índia, uma solução de sabão contendo extratos de sementes de *P. erosus* a uma concentração de 5% foi pulverizada três vezes em plantas infestadas com larvas da broca-da-vagem (*Maruca vitrata* F.) (Reddy 2015). Essa solução resultou em uma redução significativa de 45,21% na população de larvas. Além disso, a pulverização foliar aumentou o número médio de sementes por vagem, atingindo uma média de 7,64 sementes por vagem (Reddy 2015).

Silva *et al.* (2023) realizaram testes de ação bactericida usando extratos de sementes de feijão-macuco sobre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Os experimentos foram conduzidos em meio de cultura líquido LPG (levedura-peptona-glucose), com diferentes concentrações de extrato (1:200, 1:1000 e 1:2000). Observou-se que o extrato mais concentrado reduziu a multiplicação dessa bactéria em 57%.

Em relação à ação viricida, Phrutivorapongkul *et al.* (2002) investigaram a atividade dos compostos isolados das sementes de *P. erosus* contra o herpes simples (HSV) tipos 1 e 2. Eles realizaram a extração desses compostos utilizando ciclometano, clorofórmio (CHCl₃) e etanol (EtOH) a 95% por um período de 45 dias. Entre os compostos isolados, como dolineona, neotenona, paquirrizina e paquirrizona, nenhum deles apresentou atividade antiviral significativa. No entanto, os isolados 12a-hidroxdolineona e 12a-hidroxi paquirrizona demonstraram uma atividade moderada contra ambos os tipos de herpes.

Barrera-Necha *et al.* (2004) conduziram testes *in vitro* para avaliar o efeito fungicida do extrato de sementes de *P. erosus* 'Agua Dulce' sobre três tipos de fungos: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sac., *Fusarium oxysporum* Schltdl., e *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. Os extratos de *P. erosus* macerados com diclorometano (CH₂Cl₂) demonstraram maior efeito inibitório em *R. stolonifer* (-65%), *F. oxysporum* (-38%) e *C. gloeosporioides* (-36%). Além disso, metabólitos como rotenona, erosona, paquirrizona, delineona e paquirrizina, na concentração de 250 µg ml⁻¹, também inibiram o crescimento dos fungos. O maior efeito fungicida foi observado com rotenona contra *R. stolonifer*, paquirrizina contra *F. oxysporum* e desidroneotenona contra *C. gloeosporioides*.

Guimarães e Ticona-Benavente (2017) conduziram testes para avaliar o potencial fungicida de extratos de *Pachyrhizus* spp. contra *Sclerotium rolfsii* Sacc. inoculado em plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* D.). Os escleródios receberam tratamento com extrato de sementes de feijão-macuco (Figura 7A), água (Figura 7B) e Cabrio® Top. A concentração de 1:1000 do extrato de sementes de feijão-macuco reduziu a incidência do fungo em 60%.



Figura 7. A) Plântula de cubiu inoculada com escleródio de *S. rolfsii* banhado em extrato das sementes de *Pachyrhizus* spp.; B) Plântula de cubiu inoculada com escleródio banhado com água.

Fonte: Autora 2017.

O maior *screening* de genótipos de *Pachyrhizus* spp. em relação à toxicidade foi conduzido por De Lima *et al.* (2021). Neste estudo, foram avaliados os extratos de 64 progênes de feijão-macuco do banco de germoplasma do INPA quanto ao seu efeito no controle de *S. rolfsii*. Os extratos de *Pachyrhizus* spp. foram utilizados na concentração de 1:1000 e submetidos a diferentes tempos de maceração aquosa (0, 48 e 72 horas). Houve variação no nível de toxicidade e no desempenho das progênes em relação aos diferentes tempos de maceração (Figura 8). As progênes que alcançaram a máxima eficiência no controle de *S. rolfsii* foram aquelas maceradas por 48 horas, com destaque para P14 (66,5%), P5 (67,5%) e P23 (68%). Por outro lado, a progênie P61 foi considerada a menos eficaz, reduzindo apenas 21% do crescimento do micélio (De Lima *et al.* 2021).

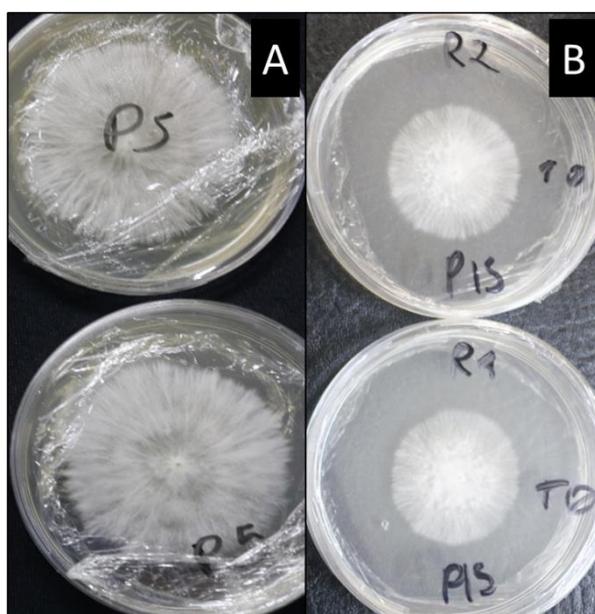


Figura 8. A) Comportamento da progênie P5; e B) da progênie P15 de *Pachyrhizus* spp. na inibição de *S. rolfsii* *in vitro*.

Fonte: De Lima 2019.

Testes de toxicidade em animais e em células humanas foram conduzidos para avaliar os efeitos dos extratos e compostos das sementes de *Pachyrhizus* spp. Abid *et al.* (2006) investigaram a atividade depressora dos extratos das sementes de *P. erosus* no sistema nervoso central de camundongos albinos suíços. Os extratos, obtidos com etanol (EtOH) e clorofórmio (CHCl₃), foram testados quanto à toxicidade oral aguda, atividade sedativo-hipnótica, atividade locomotora e coordenação muscular, bem como atividade ansiolítica. No teste de toxicidade oral aguda, foram observadas mortes em doses a partir de 175 e 1000 mg kg⁻¹ para os extratos etanólico e clorofórmico, respectivamente. No teste de atividade sedativo-hipnótica, o extrato etanólico aumentou em 1075% a duração do sono induzido por pentobarbitona. Além disso, os

extratos etanólicos na dose de 150 mg kg⁻¹ demonstraram atividade sedativa, relaxante muscular, ansiolítica e antiagressiva.

Em estudos com células humanas, Leuner *et al.* (2013) avaliaram os efeitos citotóxicos de compostos isolados de sementes de *P. tuberosus* em fibroblastos pulmonares humanos, células de câncer de mama e células de câncer colorretal. Os extratos foram testados na concentração de 400 µg g⁻¹ em um ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio). Compostos como rotenona, paquirrizina, neotenona, 12a-Hidroxdolineona e 12a-Hidroxirotenona mostraram potencialidade contra células cancerosas, sendo a rotenona o principal composto responsável pela citotoxicidade.

Estrella-Parra *et al.* (2014) avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade de *P. erosus* em células de leucemia humana *in vitro*. Os compostos rotenona, dolineona, 12a-hidroxiapaquirrizona e paquirrizina foram isolados das sementes e testados individualmente. Enquanto os compostos dolineona, 12a-hidroxiapaquirrizona e paquirrizina não apresentaram efeito citotóxico, tanto os extratos de *P. erosus* quanto a rotenona isolada demonstraram citotoxicidade em concentrações específicas. A genotoxicidade induzida pela rotenona foi observada após uma hora de exposição, resultando em morte celular, embora não tenha afetado diretamente a estrutura do DNA.

É importante observar que as sementes de *P. tuberosus* são utilizadas tradicionalmente por comunidades peruanas como purgantes para adultos e para aliviar a tosse (Balbin *et al.* 2005). No entanto, a ingestão de 40 sementes pode causar sintomas graves, como vômitos, diarreia, dispneia, tontura, convulsões, bradicardia, arritmia, coma, inconsciência e até mesmo levar à morte (De Wilde 1986; Narongchai *et al.* 2005; Patel 2011; Yu *et al.* 2020). Portanto, é fundamental ter precaução ao lidar com essas sementes e considerar seus efeitos potencialmente tóxicos.

Outra área de pesquisa explorada envolveu o potencial dos extratos das sementes de *P. erosus* como inibidores de plantas daninhas. Barbosa *et al.* (2018) conduziram um estudo sobre o efeito alelopático desses extratos na germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla* L. e *Bidens pilosa* L. Os extratos foram preparados em temperatura ambiente e fervidos em concentrações de 0, 25, 50 e 100%. Observou-se que os extratos mais concentrados e preparados com fervura reduziram a taxa de germinação em 89–92% na concentração de 25% e 100%, respectivamente. Os extratos aquosos de *P. erosus* preparados em temperatura ambiente exigiram quatro vezes mais material para obter o mesmo efeito dos extratos fervidos.

Isso abre a possibilidade de investigar mais a fundo os efeitos alelopáticos desses extratos, especialmente em relação a outras espécies de plantas daninhas.

É importante considerar a relação entre o grau de toxicidade e o estágio de amadurecimento das sementes. Duke (1981) sugeriu que as vagens e sementes de *P. erosus* podem ser consumidas quando estão imaturas, da mesma forma que se faz com o feijão-vagem. Isso foi corroborado pelo estudo de Villar (1991), que não detectou substâncias tóxicas nas sementes e vagens imaturas de *P. tuberosus*. A toxicidade foi observada apenas em vagens com mais de 15 cm. Portanto, para serem seguras para o consumo humano, as vagens deveriam ser imaturas e menores do que 15 cm. No entanto, o estudo de Silva *et al.* (2023) mostrou que havia variação na toxicidade em sementes imaturas (de 5 a 100% nas formigas *Pheidole* sp.) de diferentes genótipos de *Pachyrhizus*. Ou seja, alguns genótipos, mesmo com sementes imaturas, já possuíam uma concentração significativa de compostos tóxicos. Isso também foi observado por Kim *et al.* (2009), que extraiu 478,4 e 484,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ de rotenona de sementes imaturas e maduras, respectivamente. Além disso, há relatos de casos em que a ingestão de 80 sementes imaturas levou uma pessoa a entrar em coma em Taiwan (Yu *et al.* 2020). Portanto, a maturação das sementes não é garantia de segurança, e a toxicidade pode variar entre diferentes genótipos da planta.

2.10 Rotenona

A rotenona é um composto poliaromático com fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$ e apresenta-se como cristais incolores a acastanhados, com ponto de fusão de 163 °C e ponto de ebulição de 210 °C (PubChem 2021). Não possui odor nem sabor (PubChem 2021). Essa substância é encontrada principalmente nas famílias das leguminosas (Hayes e Laws 1991) e pode ser extraída das folhas, flores, sementes, raízes e caules de várias plantas tropicais e subtropicais dos gêneros *Tephrosia*, *Lonchocarpus*, *Derris* ou *Deguelia*, com teores de rotenona variando de 4, 5, 13 e 5–13%, respectivamente (Costa *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2020).

A rotenona também pode ser extraída das folhas, vagens e sementes de *Pachyrhizus* spp. (Villar 1991; Kim *et al.* 2009). O conteúdo de rotenona nas sementes varia dependendo da espécie (Tabela 6) e está presente principalmente nos cotilédones (Villar 1991; Catteau *et al.* 2013).

Tabela 6. Teores de rotenona nas sementes de *Pachyrhizus* spp.

Espécie	Rotenona (mg g ⁻¹ b.s.)	Referência
<i>P. ahipa</i>	0,58	Lautié <i>et al.</i> (2013b)
<i>P. erosus</i>	1,13–3,53	Lautié <i>et al.</i> (2012); Lautié <i>et al.</i> (2013b)
<i>P. panamensis</i>	1,4	Lackhan (1994)
<i>P. tuberosus</i>	1,56–2,92	Lautié <i>et al.</i> (2013b)

Pequenas quantidades de rotenona foram encontradas nas raízes de *P. tuberosus* (0,14 µg mg⁻¹ na base seca) e não foi identificada rotenona e paquirrizina nas flores, pendúnculos e caules (Villar 1991). Contudo, foram encontrados teores de rotenoides nas flores (0,06 g por 100 g) (Santos *et al.* 1996) e nas folhas de *P. erosus* (75,1 µg g⁻¹ de massa seca), bem como nas folhas de *P. ahipa* (78,8 µg g⁻¹ de m.s.) (Kim *et al.* 2009).

A rotenona bloqueia o transporte de elétrons no complexo I mitocondrial (Figura 9). Como este transporte é responsável pela produção de ATP, a sua interrupção leva a uma drástica redução na produção de energia celular (Huang *et al.* 2008; Leuner *et al.* 2013). O transporte de elétrons é também conhecido como cadeia respiratória mitocondrial e ocorre em cinco complexos proteicos na membrana interna da mitocôndria. O complexo I é o maior, com 43 subunidades, e possui uma estrutura complexa. A rotenona tem afinidade pela subunidade PSST, impedindo o transporte de elétrons dentro do complexo. Isso impede que os elétrons sigam a cadeia até serem transferidos para a coenzima Q10 (Figura 10) (Shuler e Casida 2001). Além disso, o bloqueio do complexo I resulta na produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mROS) e óxido nítrico (NO). Ambos são radicais livres que induzem estresse oxidativo e ativam o mecanismo de apoptose celular (Huang *et al.* 2008; Leuner *et al.* 2013).

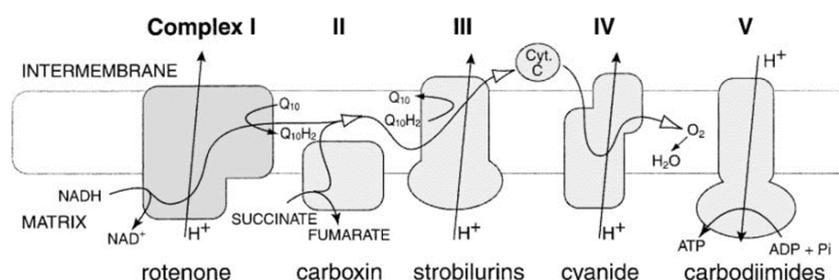


Figura 9. Cinco complexos proteicos da cadeia respiratória mitocondrial. No complexo I, a NADH cede um elétron o qual é conduzido até o complexo IV. A seu passo cria uma concentração de prótons no espaço intermembrana. O complexo V traz de volta os prótons para a matriz mitocondrial e se fabrica ATP. Fonte: Shuler e Casida 2001.

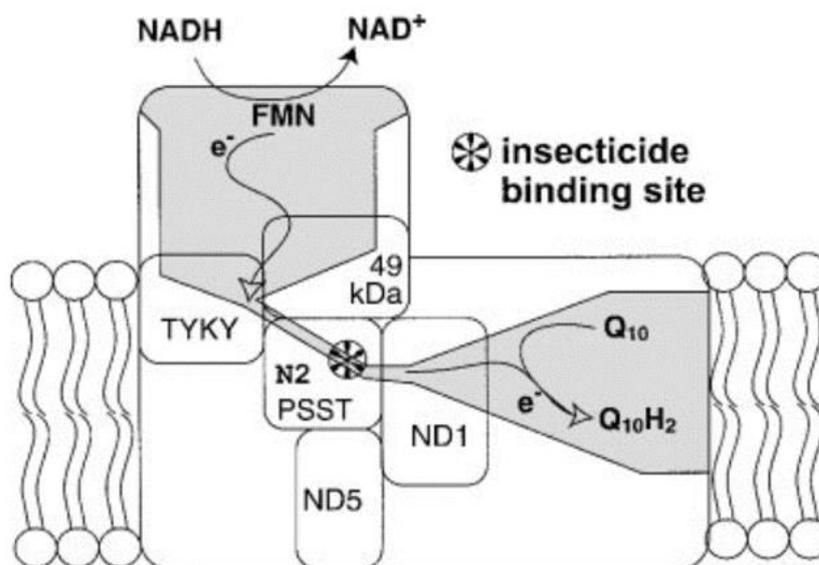


Figura 10. Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial onde o elétron cedido pelo NADH é conduzido até a coenzima Q10.
Fonte: Shuler e Casida 2001.

A rotenona possui uma ampla gama de ações tóxicas, incluindo genotoxicidade e citotoxicidade (Leuner *et al.* 2013; Estrella-Parra *et al.* 2014; Upegui *et al.* 2014). Ela também demonstra ser piscicida (Crombie e Whiting 1998; Mascaro *et al.* 1998), inseticida, acaricida (Béjar *et al.* 2000; Zubairi *et al.* 2015), viricida (Phrutivorapongkul *et al.* 2002), fungicida (Barrera-Necha *et al.* 2004; De Lima *et al.* 2021; Silva *et al.* 2023) e bactericida (Silva *et al.* 2023). Além disso, possui potencial contra malária, leishmania cutânea (Upegui *et al.* 2014) e várias linhas de células tumorais, incluindo células cancerosas humanas (Leuner *et al.* 2013).

A rotenona é considerada um dos inseticidas botânicos mais tóxicos a curto prazo e atua como veneno de contato e estomacal (Wiesbrook 2004; Alecio *et al.* 2010). As doses letais em peixes variam de 2,6 a 14,20 mg mL⁻¹ (Mascaro *et al.* 1998). Em insetos, como as vaquinhas, a dose letal é de 1,44 µl do extrato por grama do inseto (Alecio *et al.* 2010). Em seres humanos, geralmente não há efeitos sistêmicos tóxicos, pois a absorção pelo trato gastrointestinal é baixa (Castrique 2004).

A rotenona possui uma polaridade intermediária, baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes orgânicos (Medeiros e Kanis 2010; D'Andrea *et al.* 2007). Geralmente, sua extração é realizada com solventes como éter, acetona, hexano, acetonitrila (CH₃CN), metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetato de etila (AcOEt), diclorometano (CH₂Cl₂) e clorofórmio (CHCl₃) (Ahmed 2001, Barrera-Necha *et al.* 2004; Menezes 2005; Lautié *et al.* 2013a). Trabalhos que utilizam solventes de menor polaridade, como EtOH, acetona e MeOH, mostram que a extração da rotenona é mais eficiente (Corrêa 2011; Zubairi *et al.* 2015). No

entanto, trabalhos que utilizam água como solvente também têm demonstrado eficácia (Guimarães e Ticona-Benavente 2017; De Lima *et al.* 2021; Silva *et al.* 2023).

2.11 Extração da rotenona

Dentre os métodos de extração de rotenona, os mais utilizados são: maceração, Soxhlet (SOX), extração em fase sólida (EFS), extração com líquido pressurizado (ELP), extração acelerada com solvente (EAS), extração com fluido supercrítico (EFSC), extração assistida por micro-ondas (EAM) e extração ultrassônica (EUS) (Ong 2004; Sae-Yun *et al.* 2006; D'Andrea *et al.* 2007; Lautié *et al.* 2012).

A maceração é um método que possui vantagens devido à sua simplicidade no manuseio e na coleta das amostras (Zubairi *et al.* 2016). A amostra é colocada de molho no solvente em temperatura ambiente por três horas a três semanas, e após o período de extração, ocorre a filtragem e a prensagem (Rodrigues *et al.* 2016; Zubairi *et al.* 2016). A maceração pode ser realizada em repouso (estática) e sob agitação (dinâmica), sendo a segunda opção mais eficiente para a extração de compostos fenólicos (Cardoso *et al.* 2017).

No método Soxhlet (SOX), a amostra é continuamente imersa em um solvente puro (De Castro e García-Ayuso 1998). O solvente é aquecido, evaporado, condensado e reinserido no cartucho pela força da gravidade (De Castro e García-Ayuso 1998). Para a extração, são necessários de 5 a 50 g de amostra sólida (Ahmed 2001). Sua vantagem é que permite repetidas extrações com o mesmo solvente, e não há necessidade de filtrar o resultante (De Castro e García-Ayuso 1998). Por outro lado, esse método requer uma grande quantidade de solvente (100–200 mL) e é o mais demorado para a extração (3–18 h) (Ahmed 2001; Ong 2004; Lautié *et al.* 2013a). No processo Soxhlet, são utilizados solventes como EtOH, CH₂Cl₂, CHCl₃, MeOH, éter de petróleo, misturas de álcool e água, entre outros (Scramin 1994; Ong 2004; Lautié *et al.* 2013a).

A extração em fase sólida (EFS) é capaz de extrair, separar, purificar e concentrar soluções (Jardim 2010). Nesse método, sorventes (50–500 mg) são usados para reter os analitos (Ahmed 2001). Os analitos ficam retidos nos sorventes e são lavados com solventes orgânicos, sendo posteriormente recuperados por eluição (Jardim 2010). Para analitos com polaridade intermediária, como a rotenona, geralmente utiliza-se sílica como sorvente, com solventes como AcOEt, CH₂Cl₂ ou CHCl₃ (Jardim 2010). No entanto, a desvantagem desse método é que ele requer um volume amostral maior para obter uma recuperação ideal do analito (Jardim 2010).

A extração com líquido pressurizado (ELP) é realizada sob temperatura de 80–200 °C e pressão de 10-20 bar, mantendo o solvente no estado líquido (Ong 2004). Uma das vantagens desse método é o tempo de extração mais curto (20–40 min), a quantidade menor de solvente necessária (20–30 mL) e a maior solubilidade dos analitos no solvente (Ong 2004). A extração é geralmente realizada com CHCl₃ ou EtOH (Sae-Yun *et al.* 2006).

A extração acelerada com solvente (EAS) é realizada em temperaturas elevadas (80–200 °C) e sob pressões significativas (5–200 bar) (Ahmed 2001; Ong 2004). O tempo de extração é relativamente curto, variando de 20 a 40 minutos (Ong 2004). Uma das vantagens desse método é a maior solubilidade dos compostos, o que permite a redução do volume de solvente necessário (20–40 mL) (Ong 2004). Além disso, a EAS é capaz de usar solventes com diferentes polaridades (Ahmed 2001).

A extração com fluido supercrítico (EFSC) envolve o uso de fluidos que têm coeficiente de difusão mais elevado, viscosidade mais baixa e densidade semelhante à dos líquidos, como o dióxido de carbono (CO₂) ou o MeOH (Ahmed 2001; Ong 2004). O método utiliza sorventes, porém a extração e a purificação ocorrem em uma única fase (Ahmed 2001). Nesse método, sorventes são empregados, mas a extração e a purificação ocorrem em uma única fase (Ahmed 2001). Uma das vantagens desse método é que o fluido supercrítico é altamente penetrante e extrai os solutos mais rapidamente do que os líquidos (Ahmed 2001). No entanto, esse método tem a desvantagem de permitir um volume limitado de amostra (30–100 mL) (Ahmed 2001; Ong 2004).

Na extração assistida por micro-ondas (EAM), o sistema pode ser aberto ou fechado. No sistema aberto a radiação é focalizada apenas na área exposta (Mandal *et al.* 2007). No sistema fechado, a radiação é dispersa e não uniforme, como nos fornos de micro-ondas domésticos (Mandal *et al.* 2007). Na EAM, as amostras são irradiadas no micro-ondas para aquecimento (Ong 2004). Em seguida, são centrifugadas e os sobrenadantes são removidos para análise cromatográfica (Ahmed 2001). Assim como na ELP, a vantagem desse método é a utilização de uma quantidade reduzida de solvente (20–50 mL) e um tempo de extração mais curto (10–40 min) (Ong 2004; Lautié *et al.* 2013a). O sistema fechado tem a vantagem de permitir a extração simultânea de várias amostras (Mandal *et al.* 2007). Para a extração por EAM, são comuns o uso de MeOH, CH₂Cl₂, EtOH ou misturas de EtOH e água (Ong 2004; Lautié *et al.* 2013a).

Na extração ultrassônica (EUS), a energia das ondas sônicas é convertida em energia térmica (Sun *et al.* 2019). O calor resultante desnatura as proteínas, rompe as células vegetais

e, conseqüentemente, libera os compostos ativos (Sun *et al.* 2019). Isso aumenta o rendimento e reduz o tempo de extração (Vinatoru 2001). Além da energia térmica, o ultrassom cria um efeito mecânico devido à vibração de alta frequência, facilitando a penetração do solvente no tecido vegetal (Sun *et al.* 2019). O ultrassom causa menos danos aos compostos ativos e requer baixo consumo de energia (Sun *et al.* 2019).

A EUS pode ser combinada com a maceração para aumentar a eficiência da extração (Vinatoru 2001). O tratamento geralmente dura entre 20 e 45 minutos (Sun *et al.* 2019). Para isoflavonoides, a extração em EtOH (71,35%) leva aproximadamente 49 minutos (Wu *et al.* 2012). Quanto menor o tamanho das partículas da amostra, melhor será a extração (Sun *et al.* 2019).

Phrutivorapongkul *et al.* (2002) empregaram o método de maceração nas sementes de *P. erosus*. As sementes foram primeiro secas, moídas e o pó resultante foi macerado repetidamente por 45 dias com cicloexano, CHCl₃ e EtOH (95%). Em seguida, o solvente foi evaporado. O extrato com CHCl₃ permitiu a extração dos compostos desidroneotenona, dolineona, 12a-hidroxdolineona, 12a-hidroxiapaquirizona, 12a-hidroxirotenona, neotenona, paquirrizina, paquirrizona e rotenona.

Barrera-Necha *et al.* (2004) também utilizaram a técnica de maceração para extrair componentes tóxicos das sementes de *P. erosus*. No processo de extração, o pó das sementes foi macerado em solventes como CH₂Cl₂, acetona e hexano por 48 horas em temperatura ambiente, em concentrações de 0,5, 2, 5 e 10 mg mL⁻¹. Posteriormente, os extratos foram concentrados em um evaporador rotativo. O CH₂Cl₂ possibilitou a extração dos compostos rotenona, erosona, paquirrizona, delineona e paquirrizina, enquanto a desidroneotenona foi extraída no solvente acetona.

Kim *et al.* (2009) utilizaram o método de maceração para extrair rotenona de folhas, sementes imaturas e sementes maduras de *P. erosus* e *P. ahipa*. Os autores maceraram as amostras nos solventes MeOH, EtOH, CHCl₃, CH₃CN e n-hexano por dois dias a uma temperatura ambiente de aproximadamente 29 °C, na concentração de 1:10. Os resultados demonstraram que o CHCl₃ extraiu 3,6 vezes mais rotenona nas folhas de *P. ahipa* (78,8 µg g⁻¹ de m.s.) e *P. erosus* (75,1 µg g⁻¹ de m.s.) em comparação com outros solventes. Nas sementes maduras de *P. erosus*, o CHCl₃ extraiu duas vezes mais rotenona do que o MeOH (484,7 e 236 µg g⁻¹, respectivamente). Nas sementes imaturas, o CHCl₃ extraiu 3,2 vezes mais rotenona do que o MeOH (478,4 e 148,1 µg g⁻¹, respectivamente). Entre todos os solventes testados, o clorofórmio mostrou ser o mais eficaz na extração da rotenona.

Lautié *et al.* (2012), por outro lado, utilizaram o método de Soxhlet (SOX) para extrair a rotenona de sementes de *P. erosus* e *P. ahipa*. Para a extração, o pó das sementes foi misturado com CH₂Cl₂ na proporção de 1:200, e o extrato seco resultante foi mantido a uma temperatura de -18 °C. O uso de diclorometano em SOX possibilitou a extração de 90% da rotenona após 80 ciclos, o que equivale a cerca de 8 horas. A quantidade extraída variou de 1,13 a 2,76 mg g⁻¹ na base seca em diferentes acessos de *P. erosus* e *P. ahipa* (Lautié *et al.* 2012).

No método de extração ultrassônica (EUS), Lautié *et al.* (2012) misturaram pó de sementes de *P. erosus* e *P. ahipa* com CH₂Cl₂ na proporção de 1:70. A extração foi realizada quatro vezes, e entre cada uma, a amostra foi filtrada e reextraída com solvente. Não foi suficiente quatro ciclos (30 min) de ultrassom para extração completa de rotenona.

Lautié *et al.* (2013a) compararam os métodos EAM e SOX em sementes de *P. erosus* e *P. ahipa*. A extração foi realizada quatro vezes, e entre cada extração, a amostra foi filtrada e reextraída com solvente. No entanto, não foi suficiente realizar quatro ciclos de ultrassom com duração de 30 minutos cada para uma extração completa da rotenona.

Lautié *et al.* (2013b) empregaram o método de extração assistida por micro-ondas (EAM) para extrair rotenona e paquirrizina de diferentes acessos de *P. erosus*, *P. ahipa*, *P. tuberosus* e híbridos *P. ahipa* x *P. tuberosus*. Para a EAM, eles seguiram as mesmas condições utilizadas em Lautié *et al.* (2013a). A extração e a purificação por extração em fase sólida (EFS) duraram de 30 a 35 minutos. Esse método extraiu 99,42% de rotenona (3,53 mg g⁻¹) e 98,68% de paquirrizina (3,29 mg g⁻¹).

Leuner *et al.* (2013), por sua vez, utilizaram o método Soxhlet (SOX) com purificação em EFS para extrair e isolar compostos de sementes de *P. tuberosus*. Primeiro, as sementes foram secas a 60 °C, moídas e armazenadas em um recipiente livre de oxigênio e no escuro. Em SOX, os autores empregaram o solvente MeOH a 90% por 60 minutos. Esse método extraiu rotenona, erosona, 12a-hidroxierosona, 12a-hidroxidolineona, 12a-hidroxirrotenona, neotenona e paquirrizina das sementes de *P. tuberosus*.

Outro fator importante a considerar na extração da rotenona é a temperatura, uma vez que altas temperaturas podem promover a degradação da rotenona em sementes de *Pachyrhizus* spp. (Catteau *et al.* 2013; Lautié *et al.* 2013b). Além disso, a radiação solar e a exposição à luz ultravioleta também podem causar degradação da rotenona em um período que varia de 10 minutos a 2,5 dias (Cabizza *et al.* 2004; Chen *et al.* 2009) ou até quatro dias (Cabras *et al.* 2002).

Um estudo que investigou minuciosamente a sensibilidade da rotenona ao calor foi conduzido por Catteau *et al.* (2013). Neste estudo, eles examinaram os efeitos da secagem, torrefação, fervura e fritura em sementes de *P. erosus* em diferentes condições: sementes inteiras, sementes descascadas e farinha de sementes inteiras. A secagem foi realizada em uma estufa a 105 °C por 12 horas. A torrefação foi feita em placas aquecidas a 95 °C por 1 hora. A fervura ocorreu a 100 °C por 3 horas (10 g de sementes para 500 mL de água). A fritura foi realizada com 10 mL de óleo a 190 °C por 1 minuto e 30 segundos. Os resultados deste estudo indicaram que a secagem e a torrefação das sementes inteiras causaram uma degradação de aproximadamente 80% na rotenona. Na fervura, houve uma degradação de 23%, que aumentou para 65% em sementes descascadas, e esse valor pode variar dependendo da resistência dos tegumentos em diferentes espécies de *Pachyrhizus*.

Lautié *et al.* (2012) investigaram a estabilidade da rotenona em uma solução contendo MeOH (0,5 mg mL⁻¹) ao longo de um período de 0,5 a 42 dias. Eles descobriram que a rotenona foi degradada em 25% quando exposta a temperaturas de 70 °C por três horas no escuro. Por outro lado, amostras armazenadas a -18 °C no escuro sofreram uma degradação de apenas 0,32% ao longo de 42 dias. É recomendável retirar essas amostras do freezer 20 minutos antes da análise para que possam alcançar a temperatura ambiente de 25 °C. Vale ressaltar que soluções de rotenona em solventes orgânicos podem oxidar e mudar de cor, passando de amarelas para laranjas e, eventualmente, vermelhas quando expostas à luz e ao ar (PubChem 2021).

2.12 Teste de progênies

Os testes de progênies são amplamente utilizados no melhoramento de plantas com o objetivo de avaliar o genótipo dos progenitores com base nas características fenotípicas de seus descendentes (Allard 1971). Isso permite a seleção genotípica de progenitores com características desejadas para futuros cruzamentos. Além disso, os testes de progênies também podem ser úteis para a conservação de populações e para reduzir a frequência de alelos recessivos indesejados (Shimizu *et al.* 1982; Borém e Miranda 2005).

No primeiro caso, em que se deseja avaliar e selecionar progenitores com base em características específicas, o teste de progênies é realizado seguindo um delineamento experimental (Borém e Miranda 2005). Por outro lado, no segundo caso, em que o objetivo é a conservação genética, as sementes são semeadas em parcelas únicas, sem a necessidade de um

delineamento específico. O melhorista avalia o desempenho das progênies e seleciona aquelas que se destacam em relação ao caráter desejado (Borém e Miranda 2005).

Para a coleta de sementes destinadas aos testes de progênies, é fundamental acompanhar o período de floração das plantas para garantir o controle adequado (Shimizu *et al.* 1982). A coleta deve ser realizada quando a maioria das plantas estiver em fase de reprodução, garantindo a representatividade das progênies (Shimizu *et al.* 1982). Esse cuidado na coleta é essencial para obter resultados precisos e confiáveis nos testes de progênies.

2.13 Índice de seleção

Os índices de seleção desempenham um papel importante em programas de melhoramento de plantas, pois permitem a avaliação e seleção de várias características simultaneamente, reunindo características desejáveis com interesse econômico e agrônomico. Isso é especialmente útil para evitar a rejeição de genótipos pelos agricultores e aumentar o sucesso dos programas de melhoramento (Coimbra *et al.* 2000; Cruz e Regazzi 2004).

Os primeiros índices de seleção que avaliavam duas ou mais características genotípicas e fenotípicas com base na variância e covariância foram propostos por Smith (1936) e Hazel (1943). No entanto, esses métodos eram menos eficientes quando havia grandes erros amostrais (Cruz e Carneiro 2006). Para contornar esse problema, Williams (1962) introduziu o conceito de índice de seleção ponderado, onde pesos econômicos eram atribuídos às características. No entanto, essa abordagem tinha a desvantagem de que os valores dos pesos econômicos podiam variar constantemente no mercado, e algumas características não tinham um valor econômico bem definido (Teixeira *et al.* 2012).

Uma abordagem mais simples para estimar um índice de seleção foi proposta por Mulamba e Mock (1978), conhecida como índice da soma de postos (*ranks*). Nesse método, os genótipos são classificados para cada característica individualmente, de acordo com seu desempenho, do primeiro ao último lugar. Em seguida, as classificações das características de interesse são somadas, e os genótipos com as menores somas são considerados os mais promissores. Esse índice hierárquico ajuda a ordenar os genótipos de acordo com sua adequação para seleção (Ramalho *et al.* 2012).

2.14 Complexo *Ralstonia solanacearum*

O complexo *Ralstonia solanacearum* é composto por bactérias aeróbias gram-negativas, anteriormente conhecidas como *Pseudomonas solanacearum* (Kurozawa e Pavan 1997). Essas bactérias são caracterizadas por sua forma de bastonete e têm dimensões que variam de 0,5–0,7 µm de largura a 1,5–2,5 µm de comprimento (Lopes e Santos 1994).

Dentro desta espécie, foram identificadas cinco raças distintas, considerando as reações diferenciadas em seus hospedeiros (Buddenhagen *et al.* 1962). Além disso, foram descritas seis biovars, levando em consideração a capacidade de metabolização de dissacarídeos e álcool (Hayward 1994). Mais recentemente, com base na análise da sequência genômica, esses biovars foram agrupados em quatro grupos genéticos de cepas, conhecidos como filotipos (Prior e Fegan 2005).

Os biovars 3, 4 e 5 pertencem ao filotipo I e suas cepas são predominantemente encontradas na Ásia. Os biovars 1, 2A* e 2T* fazem parte do filotipo II (IIA e IIB) e são isolados principalmente na América. Os biovars 1 e 2T estão associados ao filotipo III e são comuns na África. Por fim, os biovars 1, 2 e 2T pertencem ao filotipo IV, e suas cepas são encontradas no arquipélago da Indonésia (Fegan e Prior 2005; Prior e Fegan 2005).

Com base em análises polifásicas que incluem características genéticas, morfológicas, fisiológicas e ecológicas, Safni *et al.* (2014) propuseram a divisão do complexo *Ralstonia solanacearum* em três espécies distintas: *Ralstonia pseudosolanacearum*, *R. solanacearum* e *R. syzygii*. Essa proposta foi apoiada por Prior *et al.* (2016), que realizaram comparações genômicas e proteômicas.

De acordo com essa reclassificação, os filotipos I e III foram categorizados como pertencentes à espécie *R. pseudosolanacearum*, enquanto o filotipo II foi associado à espécie *R. solanacearum*. O filotipo IV foi subdividido em três subespécies: *R. syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. e *R. syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. (Safni *et al.* 2014; EPPO 2021).

No Brasil, foram identificados os filotipos I e II (Santiago *et al.* 2017), que são os principais agentes causadores de doenças em plantações de solanáceas nas regiões Norte e Nordeste do país (Coelho Netto *et al.* 2004; Santiago *et al.* 2017). Essas bactérias apresentam alta variabilidade genética e têm a capacidade de sobreviver no solo mesmo na ausência de hospedeiros, resistindo a diferentes estresses abióticos (Salanoubat *et al.* 2002; Coelho Netto *et al.* 2003).

O patógeno *Ralstonia solanacearum* causa a murcha bacteriana em plantas, e sua infecção ocorre principalmente por meio de raízes emergentes e ferimentos nas raízes causados por práticas culturais (Vasse *et al.* 1995; Kurozawa e Pavan 1997). Após a entrada no sistema radicular, a bactéria penetra nos espaços intercelulares e coloniza o xilema (Genin 2010). Uma vez estabelecida no xilema, a bactéria começa a produzir exopolissacarídeos (EPS), que obstruem a circulação da seiva bruta, resultando na murcha e eventual morte da planta (Genin 2010). Após completar seu ciclo de vida na planta hospedeira, a bactéria retorna ao solo, onde pode sobreviver como um organismo saprofítico até infectar um novo hospedeiro (Genin e Boucher 2002).

Os sintomas da murcha bacteriana geralmente se tornam visíveis cerca de cinco a seis dias após a inoculação (Genin e Boucher 2002) e podem afetar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento (Lopes 2015). A murcha bacteriana começa tipicamente nas folhas superiores da planta e se propaga em direção ao colo, resultando no murchamento completo e na morte da planta em dois a quatro dias (Kurozawa e Pavan 1997). É importante observar que, ao contrário de algumas outras doenças de plantas, a murcha bacteriana não causa amarelecimento das folhas, mas sim a descoloração vascular (Becker *et al.* 2016). Essa doença pode causar perdas significativas na safra, chegando a 100% em áreas com histórico de cultivo afetado e cerca de 40% em áreas recém-desmatadas (Coelho Netto *et al.* 2004).

Tem sido observado que o controle químico da murcha bacteriana não é economicamente viável nem eficaz (Lopes 2015). Os dois métodos mais eficientes no controle dessa doença são o manejo preventivo, que se baseia no princípio da exclusão, e o controle genético, que envolve o plantio de variedades adaptadas e resistentes (Baptista *et al.* 2007). Além disso, a rotação de culturas com culturas como sorgo, milho e cana-de-açúcar, bem como o uso de pastagem, são práticas recomendadas para reduzir a incidência da doença (Kurozawa e Pavan 1997).

Na literatura, há vários estudos que exploram o uso de biocontrole e extratos vegetais no controle de *R. solanacearum*. Por exemplo, Rocha e Moura (2013) utilizaram rizobactérias como *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* sp. no tratamento de sementes antes do plantio, o que resultou em uma redução de até 74% no progresso da murcha bacteriana. Além disso, o uso de fungos antagonistas da bactéria, como *Trichoderma harzianum*, *T. virens* e *T. koningiide*, demonstrou a capacidade de reduzir a bactéria em até 97% *in vitro* (Guo *et al.* 2021).

Também foram conduzidos testes utilizando vários antibióticos no controle dessa bactéria *in vitro*. Rossato (2016) avaliou 16 antibióticos no controle de 48 isolados de quatro

biovars de *R. solanacearum* (1, 2A, 2T e 3) e descobriu que a Tetraciclina[®] inibiu o crescimento da bactéria. Além disso, Martins e Ticona-Benavente (2018) testaram a Tetraciclina[®] em doses de 60, 120 e 240 mg L⁻¹, sendo que a dose mais alta conseguiu controlar em até 80% o crescimento bacteriano de *R. solanacearum in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Selecionar progênies de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) com elevada produtividade de sementes e toxicidade para *Ralstonia solanacearum*.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a produtividade de sementes de nove progênies selecionadas de feijão-macuco, cultivadas com tutoramento em terra firme na Amazônia Central.

Avaliar a bioatividade de extratos de sementes de nove progênies de *Pachyrhizus* spp. no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*, utilizando três métodos: cultivo de bactérias em meio líquido com contagem de células em Câmara de Neubauer, cultivo de bactérias em meio líquido com contagem por espectrofotometria e cultivo em meio sólido com difusão em disco.

Selecionar progênies com elevada produtividade e bioatividade para o controle de *Ralstonia solanacearum* e *Sclerotium rolfsii* Sacc.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Etapa I. Teste de progênies para produtividade de sementes

O trabalho foi realizado na Estação Experimental Dr. Alejo Von Der Pahlen do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizada no km 14 na c em Manaus, Amazonas. O clima da região é tropical úmido (Af), seguindo a classificação de Köppen-Geiger (Alvares *et al.* 2013), com uma estação seca pronunciada de junho a outubro e um período chuvoso de novembro a maio (OMM 2022). A pluviosidade média anual é de 2300 mm, e a temperatura média anual é 27,4 °C (OMM 2022). O solo é classificado como Espodossolo, com textura arenosa e pH 4,8 (Anexo A).

Foram utilizadas sementes de nove progênies de feijão-macuco: P1, P5, P14, P15, P20, P23, P46, P61 e P64. Essas progênies foram selecionadas devido à sua elevada toxicidade contra *Sclerotium rolfsii* (De Lima *et al.* 2021). Para o plantio, foram selecionadas as sementes de cor bege de P1, P5, P14, P15, P20, P23 e P64, marrom de P46 e vermelha de P61. Todas as sementes provenientes do Banco de Germoplasma do INPA.

A área experimental foi preparada com o uso de um trator. Primeiramente, o trator pesado (Massey e Ferguson 250X) passou três vezes, seguido pelo microtrator (Yanmar TC-14), que passou uma vez, criando sulcos separados por 1 m. Posteriormente, uma adubação mineral foi aplicada a cada metro linear, com N-P-K (0-40-40 kg ha⁻¹), seguindo a recomendação de Stamford *et al.* (1999), juntamente com a aplicação de calcário dolomítico (2 t ha⁻¹).

Para a semeadura, as sementes foram submersas em água à temperatura ambiente por 24 h. A semeadura ocorreu em copos de 300 mL, usando substrato (Tropstrato HT Hortaliças – Vida Verde[®]), no dia 12/04/2021. Após 30 dias, as mudas foram transplantadas para o campo, seguindo o delineamento de blocos completamente casualizados com nove tratamentos (progênies), quatro repetições e quatro plantas por parcela, totalizando 144 plantas. Cada parcela foi disposta em fileira dupla com espaçamento de 1 x 1 m (Figura 11).



Figura 11. Plantio de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.).
 Fonte: Ticona-Benavente. Foto tirada em 2021 na Estação Experimental Dr. Alejo Von Der Pahlen do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas.

As plantas foram tutoradas com estacas de gliricídia (*Gliricidia sepium* (J.) K.) de 2,5 metros por cova (Figura 11). As estacas foram amarradas em arame galvanizado (n° 12), previamente esticado e sustentado por bambu (*Bambusa vulgaris* S.), ao longo da leira, a uma altura de 2 m. A capina foi realizada a cada 15 dias. A irrigação ocorreu somente no primeiro mês após o transplante para o campo.

A colheita das vagens foi realizada cinco meses após o plantio. Houve um total de três colheitas nos dias 05/10/2021, 20/10/2021 e 10/11/2021. Os caracteres foram avaliados por parcela, incluindo a massa total de vagens e de sementes (g), comprimento (cm) e largura (cm) das vagens, massa das vagens sem sementes (g), massa de 100 sementes (g) e a produtividade ($t\ ha^{-1}$). Para o comprimento e largura das vagens, foram utilizadas 10 vagens e a média foi calculada.

4.2 Etapa II. Teste de progênes no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*

O teste de progênes no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* foi conduzido em três métodos diferentes para avaliar a bioatividade dos extratos de feijão-macuco: i) contagem de células em Câmara de Neubauer, ii) leitura de absorvância em espectrofotômetro e iii) difusão em disco em meio sólido. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia e no Laboratório de Melhoramento de Hortaliças do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizado no campus III do INPA, em Manaus, Amazonas.

Foram utilizadas sementes de nove progênes de feijão-macuco: P1, P5, P14, P15, P20, P23, P46, P61 e P64 da safra de 2021 (Etapa I). Para os testes, as sementes foram selecionadas uma a uma e separadas por cor, totalizando 16 amostras, cada uma com 20 gramas (Tabela 7).

Essas sementes estavam armazenadas em sacos plásticos herméticos na geladeira (~5 °C) por oito meses.

Tabela 7. Sementes de *Pachyrhizus* spp. utilizadas para o teste de toxicidade sobre *Ralstonia solanacearum*.

Progênie/cor	Código
P1 bege	P1b
P1 vermelha	P1v
P5 bege	P5b
P5 vermelha	P5v
P14 bege	P14b
P14 vermelha	P14v
P15 bege	P15b
P20 bege	P20b
P23 bege	P23b
P23 vermelha	P23v
P46 bege	P46b
P46 vermelha	P46v
P46 marrom	P46m
P61 bege	P61b
P61 vermelha	P61v
P64 bege	P64b

As sementes passaram por um processo de esterilização superficial, que envolveu a seguinte sequência de etapas: imersão em álcool (70%) por cinco minutos, imersão em água sanitária comercial (com teor de cloro ativo entre 2 a 2,5% p/p) por cinco minutos, seguida de dez lavagens com água destilada autoclavada a 120 °C e 1 atm (água esterilizada). Posteriormente, as sementes foram cuidadosamente secas com papel toalha, e então foram armazenadas em envelopes de papel alumínio (12 x 12 cm). Esses envelopes foram submetidos a uma estufa a 50 °C por 48 horas para a completa secagem das sementes. Após a secagem, as sementes foram trituradas em moinho de bolas (SCH-MM 400) por cinco minutos, com frequência de 15 Hz s⁻¹. O pó resultante foi acondicionado em embalagens plásticas com fecho hermético, previamente tratadas com luz ultravioleta (UV) por 20 minutos. As embalagens foram inseridas dentro dos envelopes de alumínio para protegê-las da luz e em seguida, mantidas em um freezer a -17 °C.

Foi utilizado um isolado de *R. solanacearum* (Filotipo II, hospedeiro: *Solanum lycopersicum*), proveniente da Coleção do Laboratório de Fitopatologia do INPA. As bactérias estavam em estado de dormência em água esterilizada, mantida a uma temperatura de 20 °C.

Para ativas as bactérias, elas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio LPGA, composto por 5 g de extrato de levedura (Kasvi[®]), 5 g de peptona (Himedia[®]), 5 g de glicose (Biotec[®]) e 15 g de ágar (Agargel[®]) por litro de água destilada (Kpêmoura *et al.* 1996). As placas foram incubadas em uma incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 28 °C por 48 horas antes do início dos testes.

4.2.1 Contagem de células em Câmara de Neubauer

Para a obtenção dos extratos de sementes de feijão-macuco, inicialmente, o pó das sementes foi misturado com água esterilizada em erlenmeyers de 250 mL, seguindo a proporção de 1:10 (massa/volume). Essa mistura foi mantida a uma temperatura de 10 °C por 48 horas. Após o período de maceração, a mistura foi retirada da geladeira e submetida a um processo de purificação por meio de papel filtro com porosidade de 3,0 µm. Com isso, obteve-se 40 mL de volume final (vf) após a filtração.

As amostras filtradas na proporção 1:10 foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e submetidas a uma centrifugação a 5.500 rpm e 25 °C por 15 minutos, utilizando uma centrífuga MegafugeTM 16. Na câmara de fluxo laminar, o sobrenadante foi removido e passou por uma filtração adicional usando seringas estéreis de 20 mL equipadas com filtros do tipo milipore de 0,45 µm e 0,22 µm. Os extratos filtrados foram armazenados em erlenmeyers estéreis de 125 mL, vedados com algodão e papel alumínio, e posteriormente congelados em um freezer a -17 °C.

Adicionalmente, foram preparados meios LPG (compostos por 5 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, 5 g de glicose por litro de água destilada, pH 7) em erlenmeyers de 125 mL, que foram posteriormente vedados com algodão e papel alumínio. Esses meios foram autoclavados e mantidos em uma área de fluxo laminar à espera dos testes.

Dois experimentos foram conduzidos. No primeiro experimento, foram utilizados 16 extratos de sementes de feijão-macuco, conforme listados na Tabela 7, na concentração de 0,5%, juntamente com cinco tratamentos de controle. Os tratamentos de controle consistiram em Tetraciclina[®] nas concentrações de 200, 240 e 300 mg L⁻¹, meio LPG com inóculo padronizado de *R. solanacearum* e meio LPG sem inóculo. O segundo experimento foi semelhante ao primeiro, exceto pela concentração dos extratos, que foi de 5%.

Após 12 horas, no dia seguinte à filtração dos extratos, as amostras foram retiradas do freezer para descongelar à temperatura ambiente. Os extratos na proporção 1:10 foram diluídos no meio LPG de modo a alcançar concentrações finais de 0,5% e 5%. Para a preparação das doses do antibiótico, cápsulas de 500 mg foram utilizadas e diluídas em 20 mL de água

esterilizada, seguido de diluição em meio LPG para alcançar as concentrações finais de 200, 240 e 300 mg L⁻¹. Cada erlenmeyer continha um volume final de 20 mL.

As bactérias previamente cultivadas em meio LPGA foram padronizadas através de uma suspensão de inóculo utilizando um mL do meio LPG (Oliveira e Vidor 1984). Cada erlenmeyer contendo meio LPG e os diferentes tratamentos recebeu uma concentração bacteriana de 1×10^6 células mL⁻¹, cuja contagem foi realizada em uma Câmara de Neubauer.

Os erlenmeyers inoculados foram então colocados em uma incubadora shaker (modelo SL 221/E) a 150 rpm e mantidos à temperatura de 25 °C. Foram coletadas alíquotas de um mL em quatro momentos distintos: zero hora, seis horas, 12 horas e 24 horas após a inoculação. A coleta das amostras foi realizada utilizando uma pipeta automática (100:1000 µL) com ponteira de um mL, sendo que as amostras foram armazenadas em microtubos e mantidas em um freezer a -17 °C.

A contagem das bactérias foi realizada após a conclusão das coletas. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, e uma gota da amostra foi inserida em uma Câmara de Neubauer para a contagem, que foi efetuada sob um microscópio com objetiva de 40x/0,65. Para as amostras de zero hora, assumiu-se uma concentração bacteriana padrão de 1×10^6 células mL⁻¹.

4.2.2 Leitura de absorvância em espectrofotômetro

O experimento foi conduzido utilizando uma placa de microtitulação do tipo Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) com 96 poços de fundo chato, sendo considerado um poço como a unidade experimental. Antes do uso, a placa foi previamente tratada com luz ultravioleta (UV) por um período de 20 minutos. O delineamento experimental adotado foi o completamente casualizado, com um total de 38 tratamentos e quatro repetições.

Os tratamentos utilizados foram os mesmos mencionados no item 4.2.1, incluindo duas concentrações dos extratos de sementes de feijão-macuco (SFM) (0,5% e 5%), seis tratamentos de controle (Tetraciclina[®] nas doses de 200, 240 e 300 mg L⁻¹, meio LPG + inóculo padronizado de *R. solanacearum*, meio LPG sem inóculo e água esterilizada) e quatro leituras no espectrofotômetro, realizadas nos seguintes momentos: zero, seis, 12 e 24 horas após a inoculação.

As amostras, que consistiam em microtubos coletados conforme descrito no item 4.2.1, foram descongeladas à temperatura ambiente após terem sido armazenadas no freezer a -17 °C por um período de 15 dias. Cada poço da placa de microtitulação recebeu 100 µL do tratamento

correspondente. A absorvância das amostras foi medida utilizando um espectrofotômetro iMark Microplate Reader, com comprimento de onda configurado para 595 nm.

4.2.3 Difusão em disco em meio sólido LPGA (levedura-peptona-glucose-ágar)

Os extratos foram avaliados utilizando a técnica de difusão em disco de Kirby-Bauer (1966). O meio de cultura LPGA (5 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, 5 g de glucose, 15 g de ágar para um litro de água destilada, pH 7) (Kpê moua et al. 1996) foi preparado e vertido em placas de Petri de 90 mm, com aproximadamente 25 mL de meio em cada placa. Após o resfriamento do meio, foi adicionada uma alíquota de 1 mL do inóculo padronizado (meio LPG + 10^6 UFC mL⁻¹ de *R. solanacearum*) em cada placa usando uma pipeta.

O delineamento experimental adotado foi completamente casualizado, com um total de 22 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos incluíram as 16 amostras de SFM a 5% (conforme descrito na Tabela 7) e seis tratamentos de controle, que consistiram em diferentes doses do antibiótico Tetraciclina® (200, 240 e 300 mg L⁻¹), meio LPG + inóculo padronizado de *R. solanacearum* e água esterilizada. No centro de cada placa, também foi adicionado um disco de controle contendo o antibiótico na dose de 300 mg L⁻¹.

Os extratos, que estavam armazenados congelados na concentração de 1:10 (conforme descrito no Item 4.2.1), foram descongelados à temperatura ambiente. Tanto os extratos quanto o antibiótico foram diluídos em água esterilizada para atingir as concentrações finais desejadas (volume final= 20 mL). Essas soluções foram preparadas em tubos de vidro de 50 mL previamente esterilizados.

Cada placa de Petri recebeu cinco discos de papel filtro embebidos individualmente nos tratamentos, considerando um disco como uma unidade experimental. Os discos, com diâmetro de 5,5 mm, foram confeccionados a partir de papel filtro cortado com um perfurador de papel e acondicionados em tubos Falcon de 50 mL, os quais também foram autoclavados. Para a manipulação dos discos, foram utilizadas pinças de aço inoxidável previamente esterilizadas.

A avaliação dos resultados incluiu a medição dos halos de inibição e dos halos de estímulo, os quais foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital. Para cada medida, foram registradas duas leituras (Figura 12), sendo a média utilizada para análise. O halo de inibição foi calculado como a diferença entre o diâmetro total do halo e o diâmetro do disco (5,50 mm). As avaliações foram realizadas em intervalos de tempo de seis, 12, 24 e 48 horas após a inoculação.

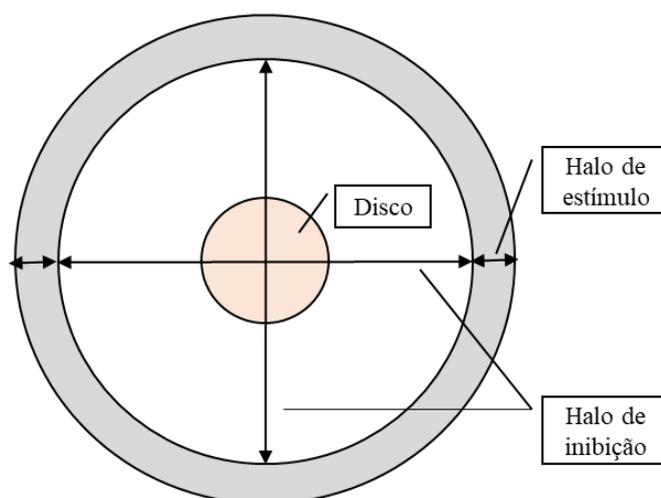


Figura 12. Esquema de avaliação dos halos de inibição e estímulo em meio LPGA.

Fonte: Adaptado de Stephanie 2009.

4.3 Etapa III. Seleção de progênies de feijão-macuco

Para realizar a seleção em nível de progênie, foram calculadas as médias dos resultados dos extratos inicialmente separados pela cor das sementes (por exemplo, para a progênie P1, a média foi calculada como $(P1b + P1v) / 2$, onde P1b representa os resultados das sementes de cor bege e P1v representa os resultados das sementes de cor vermelha). As progênies foram selecionadas com base na menor soma dos postos do índice Mulamba e Mock para os seguintes caracteres:

- i) Produtividade de sementes ($t\ ha^{-1}$) – Esses dados foram obtidos na Etapa I;
- ii) Número de células bacterianas em Câmara de Neubauer – Medido para os extratos de feijão-macuco a 0,5% em 24 horas na Etapa II.
- iii) Toxicidade contra *S. rolf sii* – Utilizando os dados de De Lima *et al.* (2021) relacionados ao potencial fungicida.

A seleção das progênies foi realizada com base na menor soma dos postos desses três caracteres, onde as progênies com menores somas de postos foram consideradas as mais promissoras para os objetivos deste estudo.

4.4 Análise estatística

Para identificar a progênie mais tóxica e produtiva de grãos, os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de comparação de médias de Duncan ($P < 0.05$). Todas as análises foram conduzidas utilizando o procedimento PROC GLM do software SAS 9.4 (SAS Institute Inc, Cary, NC, 2013). A Figura 13 ilustra as

etapas metodológicas seguidas para realizar essa análise estatística e identificar as progênes mais promissoras em termos de toxicidade e produtividade de grãos.

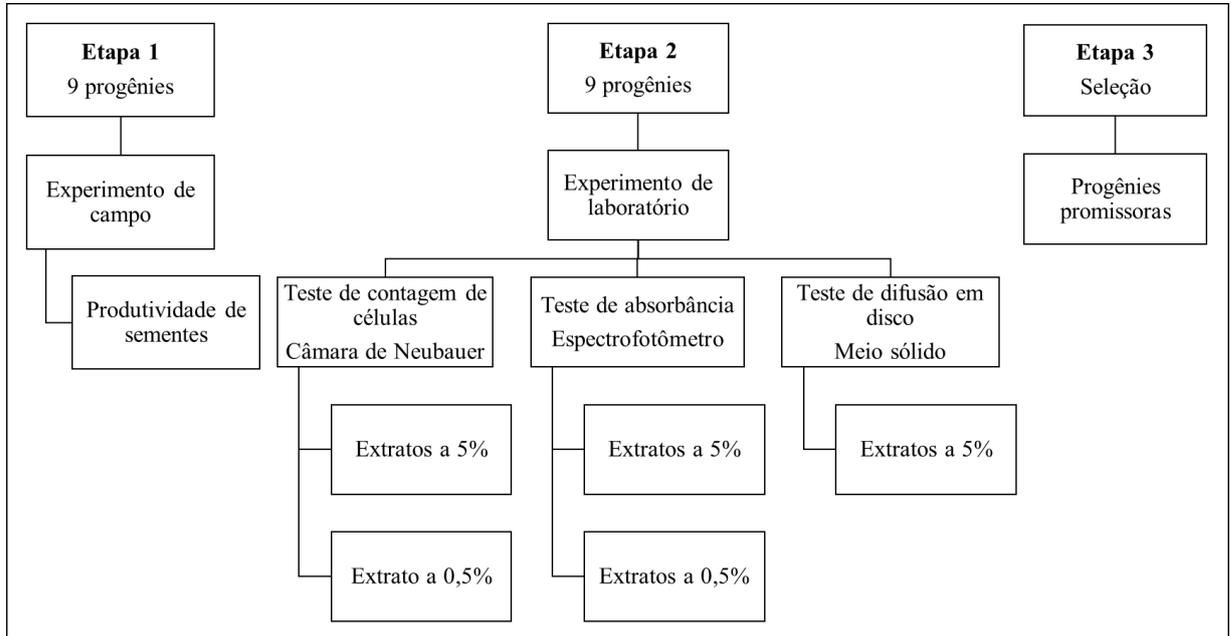


Figura 13. Fluxograma de etapas metodológicas.

Fonte: Autora 2022.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa I. Teste de progênies pela produtividade de sementes

Neste estudo, considerou-se a implementação de práticas fitotécnicas como a aração profunda da terra, o tutoramento e a adubação como estratégias para avaliar o potencial produtivo das progênies em relação às sementes de feijão-macuco. Embora essas práticas possam não ser tradicionalmente associadas ao cultivo de grãos dessa cultura, os resultados indicaram que não houve diferenças significativas nas características de estande, produtividade de vagens e produtividade de sementes entre as progênies testadas (Tabela 8). Indicando que as progênies não têm variabilidade genética para essas características. Em termos de produtividade de vagens, os valores variaram de 1,47 (P5) a 2,21 t ha⁻¹ (P23). Já em relação à produtividade de sementes, os valores variaram de 0,56 (P5) a 0,98 t ha⁻¹ (P23) (Tabela 9).

Tabela 8. Análise de variância na produção de vagens e de sementes de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) em Espodossolo arenoso. Amazonas, 2021.

Fonte de variação	Quadrado médio			Coeficiente de variação (%)	Média
	Bloco (GL=3)	Progênie (GL=8)	Erro (GL=24)		
Estande	0,550 ns	0,17 ns	0,28	14,21	3,70
Massa de 100 sementes (g)	5,100 *	7,60 **	1,12	5,00	21,20
Produtividade de vagens (t ha ⁻¹)	0,700 ns	0,30 ns	0,31	32,20	1,74
Produtividade de sementes (t ha ⁻¹)	0,110 ns	0,10 ns	0,10	35,42	0,80
Comprimento de vagens (cm)	0,150 ns	0,50 **	0,11	3,10	10,90
Largura de vagens (cm)	0,001 ns	0,01 **	0,002	2,90	1,40

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

GL: Graus de Liberdade

Tabela 9. Médias de características e produtividade de vagens e sementes de progênies de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) produzidas em Espodossolo arenoso. Amazonas, 2021.

Progênie	Estande	Massa 100 sementes (g)	Produtividade de vagem (t ha ⁻¹)	Produtividade de sementes (t ha ⁻¹)	Comprimento de vagens (cm)	Largura de vagens (cm)
P1	3,5	21,70 ab	1,88	0,80	11,15 a	1,41 abc
P5	3,5	23,20 a	1,47	0,56	10,90 a	1,46 a
P14	4,0	19,63 cd	1,84	0,83	11,11 a	1,37 bcd
P15	3,75	20,93 bc	1,50	0,66	10,70 a	1,40 abc
P20	4,0	20,90 bc	1,98	0,86	10,90 a	1,35 cd
P23	3,75	22,2 ab	2,21	0,98	11,30 a	1,46 a
P46	3,5	18,99 d	1,49	0,61	10,80 a	1,40 abc
P61	3,75	22,64 a	1,69	0,74	10,91 a	1,43 ab
P64	3,5	20,52 bcd	1,57	0,69	10,07 b	1,32 d

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

Em 2019, estas mesmas progênes foram avaliadas por Mendonça *et al.* (2020) em Latossolo argiloso sem adubação, sem tutoramento ou podas para produção de raízes. Nesse cenário, a produtividade de vagens variou de 0,29 (P20) a 0,86 t ha⁻¹ (P64) e a produtividade de sementes de 0,13 (P20) a 0,35 t ha⁻¹ (P1). A produtividade de vagens e sementes foi significativamente menor em comparação com os resultados obtidos neste trabalho. Isso sugere que a produtividade das vagens e sementes do feijão-macuco é influenciada por fatores como o tipo de solo, a disponibilidade de nutrientes (especificamente fósforo e potássio) e práticas de manejo, como tutoramento. A ausência ou baixa disponibilidade desses fatores pode limitar o desenvolvimento das plantas de feijão-macuco, afetando negativamente sua produtividade (Stamford *et al.* 1999; Balbin *et al.* 2005).

Ao observar especificamente a progênie P23, notou-se que a produtividade de sementes foi de 0,98 t ha⁻¹ (Tabela 9) e no trabalho de Mendonça *et al.* (2020) foi de 0,16 t ha⁻¹ (Mendonça *et al.* 2020). Estes resultados indicam claramente a influência de fatores como tutoramento e adubação com fósforo (P) e potássio (K) na produtividade de sementes do feijão-macuco, com um aumento notável de 500% na produtividade de sementes.

A produtividade de sementes de *Pachyrhizus* em condições de estresse hídrico foi avaliada por Zanklan *et al.* (2007). A produtividade em ambiente irrigado e sob estresse hídrico de *P. ahipa* foi de 3,04 e 1,10 t ha⁻¹ e de *P. erosus* foi de 5,66 e 4,69 t ha⁻¹, respectivamente (Zanklan *et al.* 2007). Os dados indicam que o estresse hídrico pode reduzir a produtividade de sementes e que essa redução pode variar dependendo da espécie (Zanklan *et al.* 2007). Neste trabalho, o cultivo foi realizado em período de seca e não houve irrigação no decorrer do cultivo, o que pode ter afetado negativamente o rendimento das sementes.

O número de vagens por planta (NVP) variou de 41,78 (P5) a 59,73 (P23) e cada vagem possuiu de 3–11 sementes. As mesmas progênes cultivadas em Latossolo amarelo argiloso, sem adubação e tutoramento, variaram de 2,42 (P23) a 10,22 (P64) vagens por planta (Mendonça *et al.* 2020). Em 2017 e 2018, as progênes P14, P15 e P64 cultivadas em Argissolo vermelho amarelo, sem tutoramento e com adubação orgânica, produziram de 10 a 14,45 vagens por planta (Silva 2019). Em um trabalho na Coreia do Sul com adubação e sem tutoramento, Kim *et al.* (2009) obtiveram 17,4 vagens por planta. Zanklan *et al.* (2007) tiveram o NVP variando de 20 a 55 em manejo com tutoramento e sem adubação. Estes resultados indicam que o NVP em *Pachyrhizus* spp. é influenciado por uma interação entre genética, ambiente e práticas culturais. O tutoramento desempenha um papel significativo no NVP, sendo responsável pelo aumento de mais de 300%. Considerar esses fatores ao planejar o cultivo do feijão-macuco é fundamental para otimizar a produção.

Os resultados destacam a existência de variabilidade genética em três características importantes do feijão-macuco: a massa de 100 sementes, o comprimento das vagens e a largura das vagens (Tabela 8). Isso indica que essas características podem ser alvo de seleção e melhoramento genético para otimizar a produção e as características desejáveis, como sementes mais pesadas e vagens mais longas e largas. A massa de 100 sementes variou de 18,99 (P46) a 23,2 g (P5) (Tabela 8). Kim *et al.* (2009) obtiveram 23,7 g, Zanklan *et al.* (2007) obtiveram de 22,5 a 37,0 g. Embora os resultados deste estudo não tenham alcançado valores tão altos quanto os obtidos pelos autores supracitados, ainda há uma ampla faixa de variação que pode ser explorada para selecionar sementes com maior massa.

O comprimento das vagens variou de 10,07 (P64) a 11,3 cm (P23) e a largura variou de 1,32 (P64) a 1,46 cm (P5 e P23) (Tabela 9). Estes resultados em comparação com estudos anteriores de Mendonça *et al.* (2020), indicam que as progênies avaliadas neste trabalho têm vagens, em média, mais longas. Ribeiro *et al.* (2011) avaliaram as 64 progênies do banco de germoplasma do INPA na safra de 2007-2008 e encontraram vagens medindo de 10 a 14,5 cm de comprimento. É importante ressaltar que a variação nas características das vagens pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais, bem como o manejo.

As nove progênies aqui testadas fazem parte das 64 progênies melhoradas de feijão-macuco do banco de germoplasma do INPA. Estas progênies são descendentes de 13 acessos de *P. tuberosus* e *P. erosus* provenientes do Mato Grosso (Brasil) e do México, respectivamente (Silva *et al.* 2016). Inicialmente os acessos de *P. tuberosus* eram caracterizados pela presença de flores brancas e de *P. erosus* flores violetas, contudo, houve perda de identidade taxonômica por cruzamentos naturais.

Neste trabalho, as nove progênies apresentaram tanto plantas com flores violetas como brancas (Figura 14). Esta variação na cor das flores entre e dentre as mesmas progênies também foi relatada por Ribeiro *et al.* (2011) na safra de 2007-2008. Na Coreia, Kim *et al.* (2009) encontraram flores brancas ou violetas para *P. erosus* e apenas violetas em *P. ahipa*, porém esta última não produziu sementes.

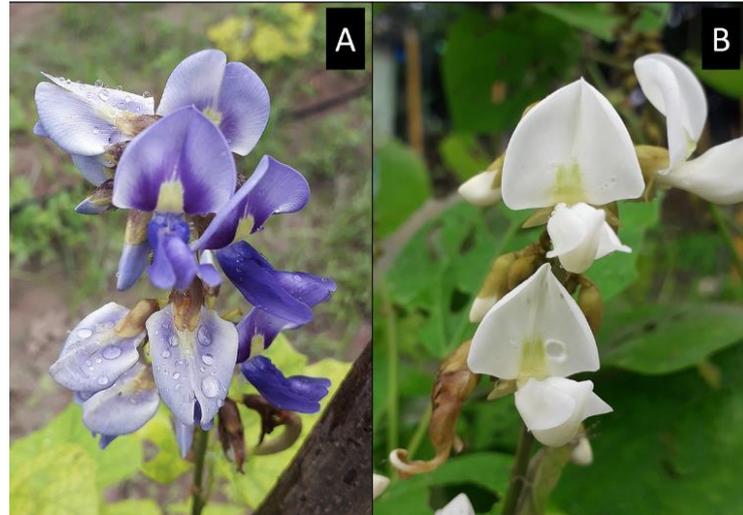


Figura 14. A) Flores violetas e B) brancas de *Pachyrhizus* spp.
Fonte: Autora. Foto tirada em 2021 na Estação Experimental Dr. Alejo Von Der Pahlen do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus, Amazonas.

A cor das sementes dentro das progênies variou entre vermelho, bege e marrom (Figura 15). A mesmas progênies cultivadas em Latossolo amarelo argiloso em 2021 apresentaram uma gama mais ampla de cores, incluindo bege, vermelha, púrpura e marrom (dados não publicados), embora a padronização da cor das sementes para semeadura não tenha sido padronizada como neste trabalho (Tabela 10). A variação na cor das sementes dentro da coleção também foi relatada por Ribeiro *et al.* (2011), a qual encontraram sementes de cor vermelha, marrom e púrpura. Além disso, esta variação fenotípica foi observada em Benin, sementes pretas produziram sementes de cor bege e vermelha (Gruneberg *et al.* 2016).

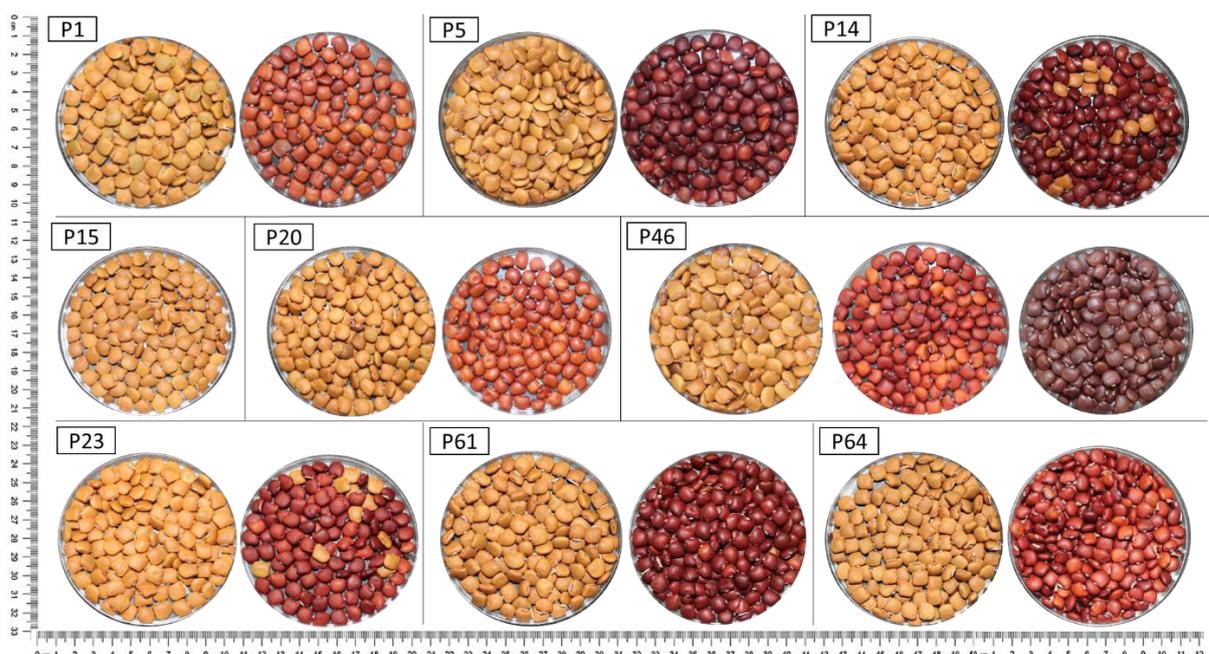


Figura 15. Sementes colhidas de nove progênies de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.).
Fonte: Autora 2022.

Tabela 10. Cores das sementes de *Pachyrhizus* spp. produzidas em Espodossolo arenoso.

Sementes plantadas	Sementes colhidas (Figura 15)
P1 bege	Bege, vermelha
P5 bege	Bege, vermelha
P14 bege	Bege, vermelha
P15 bege	Bege, vermelha
P20 bege	Bege, vermelha
P23 bege	Bege, vermelha
P46 marrom	Bege, vermelha e marrom
P61 vermelha	Bege, vermelha
P64 bege	Bege, vermelha

O feijão-macuco é descrito como uma planta autógama, o que significa que geralmente se autopoliniza, mas ainda pode haver uma taxa de cruzamento de 2 a 4% (Sørensen 1996). Isso sugere que, apesar de sua autopolinização, a presença de insetos polinizadores pode contribuir para a variabilidade genética. Em campo, observou-se com frequência a presença de abelhas mamangaba-preta (*Bombus atratus*) que abriam a quilha das flores, deixando o aparelho reprodutor exposto (Figura 16). Essas observações sugerem que a variação na cor das sementes do feijão-macuco pode ser influenciada pela atividade de insetos polinizadores. Essas informações podem ser relevantes para estudos de genética de plantas e para compreender a diversidade fenotípica dessa espécie.



Figura 16. A) *Bombus atratus* na flor de *Pachyrhizus* spp.; B) aparelho reprodutor da flor exposto.

Fonte: Autora. Foto tirada em 2021 na Estação Experimental Dr. Alejo Von Der Pahlen do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus, Amazonas.

5.2 Etapa II. Teste de progênies no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*

5.2.1 Contagem de células bacterianas em Câmara de Neubauer

5.2.1.1 Testes com extratos de feijão-macuco a 5%

Os resultados mostraram que houve variância significativa para os tratamentos em todos os tempos avaliados: 0, 6, 12 e 24 horas após inoculação (Tabela 11), indicando que as progênies têm respostas diferentes em relação ao controle da bactéria *Ralstonia solanacearum* (RS). Após seis horas da inoculação, foi observada uma multiplicação significativa das células bacterianas nos meios que continham extrato de feijão-macuco. Os valores variaram de $2,28 \times 10^8$ (P5v) a $31,2 \times 10^8$ células mL⁻¹ (P1v) (Tabela 12), dependendo da progênie. No entanto, é importante notar que a taxa de multiplicação bacteriana nos meios com extrato de feijão-macuco foi mais elevada do que o número de bactérias no meio LPG + bactéria ($0,40 \times 10^8$ mL⁻¹).

Tabela 11. Análise de variância do número de células de *Ralstonia solanacearum* filotipo II em meio líquido de zero a 24 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 5%.

Fonte de variação	Quadrado médio		Coeficiente de variação (%)	Média
	Tratamento (GL= 20)	Erro (GL= 21)		
Tempo 0h	$9,52 \times 10^{10}$ **	0	0	$952,0 \times 10^8$
6h	$1,43 \times 10^{18}$ **	$4,96 \times 10^{16}$	26,42	$8,4 \times 10^8$
12h	$3,54 \times 10^{18}$ **	$1,30 \times 10^{17}$	17,25	$20,9 \times 10^8$
24h	$9,32 \times 10^{20}$ **	$3,01 \times 10^{19}$	14,55	$377,0 \times 10^8$

**, *, ns. Significativo a $P < 0,01$, a $P < 0,05$ e não significativo respectivamente pelo teste F.
GL= Grau de liberdade

Tabela 12. Médias do número de células de *Ralstonia solanacearum* filotipo II em meio líquido de zero a 24 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 5%.

Tratamento	(células mL ⁻¹)			
	0 hora	6 horas	12 horas	24 horas
P1 bege	1 x 10 ⁶ a	5,63 x 10 ⁸ fghi	15,5 x 10 ⁸ f	368 x 10 ⁸ cd
P1 vermelho	1 x 10 ⁶ a	31,2 x 10 ⁸ a	37,6 x 10 ⁸ a	653 x 10 ⁸ a
P5 bege	1 x 10 ⁶ a	12,5 x 10 ⁸ de	22,3 x 10 ⁸ def	349 x 10 ⁸ d
P5 vermelho	1 x 10 ⁶ a	2,28 x 10 ⁸ ij	20,0 x 10 ⁸ ef	479 x 10 ⁸ bcd
P14 bege	1 x 10 ⁶ a	3,68 x 10 ⁸ hij	31,1 x 10 ⁸ abc	494 x 10 ⁸ bc
P14 vermelho	1 x 10 ⁶ a	18,5 x 10 ⁸ c	36,8 x 10 ⁸ a	641 x 10 ⁸ a
P15 bege	1 x 10 ⁶ a	4,70 x 10 ⁸ ghij	29,2 x 10 ⁸ abcd	543 x 10 ⁸ ab
P20 bege	1 x 10 ⁶ a	17,1 x 10 ⁸ cd	30,8 x 10 ⁸ abc	543 x 10 ⁸ ab
P23 bege	1 x 10 ⁶ a	9,25 x 10 ⁸ efg	19,8 x 10 ⁸ ef	423 x 10 ⁸ bcd
P23 vermelho	1 x 10 ⁶ a	7,51 x 10 ⁸ efghi	21,9 x 10 ⁸ def	454 x 10 ⁸ bcd
P46 bege	1 x 10 ⁶ a	9,66 x 10 ⁸ efg	25,7 x 10 ⁸ cde	460 x 10 ⁸ bcd
P46 vermelho	1 x 10 ⁶ a	6,18 x 10 ⁸ fghi	34,5 x 10 ⁸ ab	469 x 10 ⁸ bcd
P46 marrom	1 x 10 ⁶ a	10,2 x 10 ⁸ ef	35,7 x 10 ⁸ ab	498 x 10 ⁸ bc
P61 bege	1 x 10 ⁶ a	4,69 x 10 ⁸ ghij	28,1 x 10 ⁸ bcde	403 x 10 ⁸ cd
P61 vermelho	1 x 10 ⁶ a	8,76 x 10 ⁸ efgh	20,9 x 10 ⁸ def	465 x 10 ⁸ bcd
P64 bege	1 x 10 ⁶ a	24,8 x 10 ⁸ b	29,2 x 10 ⁸ abcd	547 x 10 ⁸ ab
Tetraciclina® 200 mg L ⁻¹	1 x 10 ⁶ a	0,07 x 10 ⁸ j	0,05 x 10 ⁸ g	0,06 x 10 ⁸ f
Tetraciclina® 240 mg L ⁻¹	1 x 10 ⁶ a	0,04 x 10 ⁸ j	0,05 x 10 ⁸ g	0,05 x 10 ⁸ f
Tetraciclina® 300 mg L ⁻¹	1 x 10 ⁶ a	0,02 x 10 ⁸ j	0,02 x 10 ⁸ g	0,03 x 10 ⁸ f
Meio LPG + bactéria	1 x 10 ⁶ a	0,40 x 10 ⁸ j	0,41 x 10 ⁸ g	126 x 10 ⁸ e
Meio LPG sem bactéria	0 b	0 j	0 g	0,00125 x 10 ⁸ f

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

Após 12 horas da inoculação, a tendência de multiplicação bacteriana nos meios LPG com extrato de feijão-macuco foi semelhante à observada após 6 horas. Os valores continuaram variando, dependendo da progênie, e a multiplicação bacteriana ainda foi mais elevada nos meios com extrato de feijão-macuco (15,5 x 10⁸ a 37,6 x 10⁸ células mL⁻¹) em comparação com o controle negativo LPG + bactéria (0,41 x 10⁸ células mL⁻¹).

Por outro lado, o resultado variou entre cores de sementes dentro do mesmo genótipo. Por exemplo, o número de bactérias no extrato de sementes da progênie 1 bege (P1b) foi 5,63 x 10⁸ células mL⁻¹ e da mesma progênie cor vermelha (P1v) foi 31,2 x 10⁸ células mL⁻¹ (Tabela 12). Isto indica que as cores das sementes de uma mesma progênie, induzem a multiplicação bacteriana com intensidades diferentes, destacando a complexidade da interação entre as características genéticas do feijão-macuco e a bactéria RS.

Após 24 horas, os extratos de feijão-macuco mantiveram a tendência de estimular a multiplicação bacteriana, com valores ainda variando significativamente entre as progênies e cores de sementes (349 x 10⁸ (P5b) a 653 x 10⁸ (P61v) células mL⁻¹). Enquanto isso, no controle negativo (LPG + bactéria), houve um crescimento bacteriano, mas a taxa de crescimento foi

significativamente menor do que nos meios com extratos de feijão-macuco (126×10^8 células mL^{-1}).

Para o antibiótico Tetraciclina[®], as doses 200, 240 e 300 mg L^{-1} não diferiram significativamente após 6, 12 e 24 horas sobre a multiplicação bacteriana (Tabela 11). Em seis horas, as doses de 200, 240 e 300 mg L^{-1} controlaram em 81, 90 e 95% o número de células, respectivamente. Em 12 horas, as doses controlaram mais de 88, 89 e 96%, respectivamente. Em 24 horas, todas as doses reduziram em 99,95% o número de células de *R. solanacearum*. Os resultados obtidos estão em conformidade com Martins e Ticona-Benavente (2018) que testaram o mesmo antibiótico em doses de 60, 120 e 240 mg L^{-1} sobre a mesma bactéria e a dose mais concentrada reduziu em 80% a população bacteriana em meio líquido.

Surpreendentemente, os extratos de feijão-macuco a 5% promoveram a multiplicação bacteriana em vez de reduzi-la, contrariando as expectativas de controle da bactéria. Isso pode ter implicações importantes na escolha de estratégias de controle de RS. Esses resultados mostraram a necessidade de investigações adicionais para entender as interações entre as progênies de feijão-macuco e RS e determinar as implicações práticas para o controle de doenças bacterianas.

5.2.1.2 Testes com extratos de feijão-macuco a 0,5%

Nos testes com extratos de feijão-macuco na dose de 0,5% se espera resultados semelhantes ao teste com 5%. Porém, o trabalho de Silva *et al.* (2023) mostrou que 0,5% controlava RS. A fim de verificar este dado com outros genótipos se fez este teste e os resultados mostraram que houve diferença estatística entre os tratamentos (extratos + controles) para todos os períodos avaliados (Tabela 13).

Tabela 13. Análise de variância do número de células de *Ralstonia solanacearum* filotipo II em meio líquido de zero a 24 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 0,5%.

Fonte de variação	Quadrado médio			Média
	Tratamento (GL= 20)	Erro (GL= 21)	Coefficiente de variação (%)	
Tempo 0h	$9,52 \times 10^{10}$ **	0	0	$9,52 \times 10^{10}$
6h	$5,11 \times 10^{16}$ **	$5,61 \times 10^{15}$	27,40	$2,73 \times 10^8$
12h	$2,68 \times 10^{17}$ **	$9,87 \times 10^{15}$	16,06	$6,19 \times 10^8$
24h	$1,35 \times 10^{19}$ **	$1,80 \times 10^{17}$	20,12	$21,1 \times 10^8$

** , * , ns. Significativo a $P < 0,01$, a $P < 0,05$ e não significativo respectivamente pelo teste F.
GL= Grau de liberdade

Assim como nos testes anteriores, os extratos de feijão-macuco a 0,5% inicialmente promoveram a multiplicação bacteriana após 6 e 12 horas de inoculação. Em seis horas, o número de bactérias nos extratos de feijão-macuco variou de $2,25 \times 10^8$ (P20b) a $4,63 \times 10^8$ células mL⁻¹ (P14v) (Tabela 14). Após 12 horas de inoculação, o número de bactérias nos extratos de feijão-macuco variou de $6,75 \times 10^8$ (P23v e P61v) a 10×10^8 células mL⁻¹ (P1b e P1v). Esses dados corroboram com os resultados anteriores e sugere que, nas primeiras horas após a exposição, esses extratos podem não atuar como agentes antibacterianos eficazes.

Tabela 14. Médias do número de células de *Ralstonia solanacearum* filotipo II em meio líquido de zero a 24 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 0,5%.

Tratamento	(células mL ⁻¹)			
	0 hora	6 horas	12 horas	24 horas
P1 bege	1×10^6 a	$4,25 \times 10^8$ a	$10,1 \times 10^8$ a	$22,6 \times 10^8$ cd
P1 vermelho	1×10^6 a	$3,50 \times 10^8$ ab	$10,3 \times 10^8$ a	$39,7 \times 10^8$ b
P5 bege	1×10^6 a	$3,13 \times 10^8$ ab	$9,25 \times 10^8$ abc	$24,8 \times 10^8$ c
P5 vermelho	1×10^6 a	$3,38 \times 10^8$ ab	$8,88 \times 10^8$ abcd	$22,3 \times 10^8$ cd
P14 bege	1×10^6 a	$4,50 \times 10^8$ a	$7,00 \times 10^8$ cd	$12,9 \times 10^8$ d
P14 vermelho	1×10^6 a	$4,63 \times 10^8$ a	$7,00 \times 10^8$ cd	$16,1 \times 10^8$ cd
P15 bege	1×10^6 a	$3,75 \times 10^8$ ab	$9,50 \times 10^8$ ab	$19,4 \times 10^8$ cd
P20 bege	1×10^6 a	$2,25 \times 10^8$ b	$7,00 \times 10^8$ cd	$14,6 \times 10^8$ cd
P23 bege	1×10^6 a	$3,38 \times 10^8$ ab	$7,13 \times 10^8$ cd	$12,4 \times 10^8$ d
P23 vermelho	1×10^6 a	$3,38 \times 10^8$ ab	$6,75 \times 10^8$ d	$16,8 \times 10^8$ cd
P46 bege	1×10^6 a	$4,13 \times 10^8$ a	$7,38 \times 10^8$ bcd	$19,3 \times 10^8$ cd
P46 vermelho	1×10^6 a	$3,13 \times 10^8$ ab	$9,75 \times 10^8$ a	$22,4 \times 10^8$ cd
P46 marrom	1×10^6 a	$3,75 \times 10^8$ ab	$8,13 \times 10^8$ abcd	$22,1 \times 10^8$ cd
P61 bege	1×10^6 a	$2,88 \times 10^8$ ab	$7,13 \times 10^8$ cd	$15,7 \times 10^8$ cd
P61 vermelho	1×10^6 a	$3,25 \times 10^8$ ab	$6,75 \times 10^8$ d	$15,5 \times 10^8$ cd
P64 bege	1×10^6 a	$3,63 \times 10^8$ ab	$7,38 \times 10^8$ bcd	$19,3 \times 10^8$ cd
Tetraciclina [®] 200 mg L ⁻¹	1×10^6 a	$0,07 \times 10^8$ c	$0,05 \times 10^8$ e	$0,06 \times 10^8$ e
Tetraciclina [®] 240 mg L ⁻¹	1×10^6 a	$0,04 \times 10^8$ c	$0,05 \times 10^8$ e	$0,05 \times 10^8$ e
Tetraciclina [®] 300 mg L ⁻¹	1×10^6 a	$0,02 \times 10^8$ c	$0,02 \times 10^8$ e	$0,03 \times 10^8$ e
Meio LPG + bactéria	1×10^6 a	$0,40 \times 10^8$ c	$0,41 \times 10^8$ e	126×10^8 a
Meio LPG	0 b	0 c	0 e	$0,00125 \times 10^8$ e

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

Em 24 horas após inoculação, os extratos de feijão-macuco a 0,5% demonstraram um efeito de controle bacteriano. O número de bactérias nos extratos de feijão-macuco variou de $12,4 \times 10^8$ (P23b) a $39,7 \times 10^8$ células mL⁻¹ (P1v) (Tabela 14). Mas, no meio LPG + bactéria se observou 126×10^8 células mL⁻¹. Isto equivale a uma redução de 68 a 90% na população bacteriana por causa dos extratos de feijão-macuco. Os resultados também destacam que algumas progênies mostraram um potencial antibacteriano mais eficiente do que outras. As

progênes com maior potencial antibiótico foram P23b, P14b e P20b, que reduziram a população bacteriana em 90, 89 e 88%, respectivamente.

Os resultados com esta dose de 0,5% a 24 horas sugerem que são necessários mais testes com extratos mais diluídos e em períodos mais longos (além de 24 horas). Silva *et al.* (2023) testaram o potencial bactericida da progênie P40 de *Pachyrhizus* spp. nas concentrações de 0,5%, 0,1% e 0,05% e esses autores concluíram que o extrato a 0,5% apresenta o efeito antibiótico mais eficiente, controlando 57% de RS filotipo I *in vitro*. Também, deve-se considerar que há diferença do controle entre isolados (Silva *et al.* 2023). Assim, o presente trabalho utilizou um isolado de RS filotipo II e os autores supracitados o isolado do filotipo I. Sendo assim, é importante selecionar cuidadosamente a concentração dos extratos de feijão-macuco e considerar a diversidade genética da bactéria alvo ao desenvolver estratégias de controle.

Ressalta-se que no método de contagem de bactérias em Câmara de Neubauer é considerado a quantidade total de células presentes, ou seja, a presença de células vivas e mortas (Sieuwerts *et al.* 2008), o que pode não refletir com precisão o efeito dos extratos de feijão-macuco sobre as células bacterianas viáveis. Portanto, para avaliar de forma mais precisa a capacidade dos extratos de feijão-macuco de controlar a bactéria RS, é aconselhável usar métodos que se concentrem na contagem de células bacterianas viáveis.

Os métodos recomendados para isso incluem a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), onde determina-se o número de células bacterianas viáveis que podem formar colônias em meio sólido. Isso fornece uma avaliação mais precisa da capacidade dos extratos de feijão-macuco de inibir ou matar as células bacterianas que podem continuar a se reproduzir. Além disso, a avaliação da bioatividade dos extratos vegetais pode ser realizada usando métodos em meio sólido, como a difusão em disco e o método de poços. Esses métodos podem fornecer informações sobre a capacidade dos extratos de feijão-macuco de inibir o crescimento bacteriano em condições controladas de laboratório. Isso ajudará a obter resultados mais robustos sobre a eficácia desses extratos como agentes de controle bacteriano.

5.2.2 Leitura da absorvância em espectrofotômetro

5.2.2.1 Testes com extratos de feijão-macuco a 5%

A leitura da absorvância em espectrofotômetro é um método amplamente utilizado para avaliar a atividade e o potencial de compostos em extratos vegetais. Neste caso, os resultados indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos (extratos e testemunhas) em 0, 6, 12 e 24 horas. Os coeficientes de variação foram mais elevados em 0, 6, e 12 horas (9 a 32%) em comparação com 24 horas (2,25%) (Tabela 15). Mostrando que há maior precisão na avaliação em 24h, sendo, portanto, mais confiável essa avaliação.

Tabela 15. Análise de variância da absorvância dos tratamentos de zero a 24 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 5%.

Fonte de variação	Quadrado médio		Coeficiente de variação (%)	Média
	Tratamento (GL= 21)	Erro (GL= 66)		
Tempo 0h	0,38 **	0,0178	31,74	0,42
6h	0,18 **	0,0010	9,11	0,35
12h	0,10 **	0,0021	14,34	0,32
24h	1,24 **	0,0005	2,25	0,99

** , * , ns. Significativo a $P < 0,01$, a $P < 0,05$ e não significativo respectivamente pelo teste F.
GL= Grau de liberdade

Em zero horas após a inoculação, a absorvância dos extratos aquosos na concentração de 5% variou de 0,31 (P61v) a 1,17 (P46m) (Tabela 16). No entanto, é importante observar que a absorvância na testemunha LPG + bactéria foi significativamente mais baixa (0,05), indicando que os próprios extratos contribuíram para a turbidez da solução. Isso sugere que os extratos podem ter componentes que afetam a medida da absorvância, mesmo antes da exposição às bactérias.

Tabela 16. Médias da absorvância dos tratamentos de zero a 24 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 5%.

Tratamento	0 hora	6 horas	12 horas	24 horas	24h - 0h
P1 bege	0,42 def	0,37 fg	0,38 cde	1,36 bc	0,94
P1 vermelho	0,96 b	0,67 a	0,41 bcd	1,43 a	0,47
P5 bege	0,35 ef	0,32 gh	0,34 e	1,27 f	0,92
P5 vermelho	0,43 def	0,59 b	0,35 de	1,44 a	1,01
P14 bege	0,35 f	0,29 h	0,42 bcd	1,27 f	0,92
P14 vermelho	0,46 def	0,41 ef	0,45 bc	1,28 f	0,82
P15 bege	0,71 c	0,37 fg	0,43 bc	1,29 ef	0,58
P20 bege	0,42 def	0,70 a	0,54 a	1,29 ef	0,87
P23 bege	0,68 c	0,52 c	0,47 b	1,19 g	0,51
P23 vermelho	0,75 c	0,38 f	0,39 bcde	1,32 de	0,57
P46 bege	0,56 cde	0,52 c	0,39 cde	1,33 cd	0,77
P46 vermelho	0,44 def	0,33 gh	0,40 bcde	1,28 f	0,84
P46 marrom	1,17 a	0,48 cd	0,37 cde	1,33 cd	0,16
P61 bege	0,39 def	0,46 de	0,43 bc	1,37 b	0,98
P61 vermelho	0,31 f	0,30 h	0,34 e	1,46 a	1,15
P64 bege	0,60 cd	0,62 b	0,55 a	1,35 bcd	0,75
Média dos extratos	0,45	0,44	0,41	1,32	0,83
Tetraciclina® 200 mg L ⁻¹	0,06 g	0,05 j	0,06 g	0,06 j	0,00
Tetraciclina® 240 mg L ⁻¹	0,05 g	0,09 ij	0,11 fg	0,12 i	0,07
Tetraciclina® 300 mg L ⁻¹	0,05 g	0,10 i	0,14 f	0,11 i	0,06
Meio LPG + bactéria	0,05 g	0,05 j	0,07 fg	0,31 h	0,26
Meio LPG sem bactéria	0,06 g	0,05 j	0,07 g	0,05 j	-0,01
Água esterilizada	0,06 g	0,05 j	0,05 g	0,05 j	-0,01

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

Em seis horas após a inoculação, a leitura da absorvância dos extratos variou de 0,29 (P14b) a 0,70 (P20b) (Tabela 16). No entanto, a absorvância da testemunha LPG + bactéria permaneceu baixa (0,05). Desta forma, não se pode atribuir que os extratos estimularam a multiplicação bacteriana visto que no início do teste os extratos tinham maior turbidez. Entretanto, se pode observar uma tendência geral a diminuir a turbidez dos extratos (Tabela 16), o que pode sugerir que as bactérias estão se alimentando de nutrientes ou componentes dos extratos.

Após 12 horas da inoculação, a absorvância dos extratos variou de 0,34 (P5b e P61v) a 0,55 (P64b) (Tabela 16). No entanto, a absorvância da testemunha LPG + bactéria foi de 0,07. Ao comparar com 6h, observa-se que a metade dos extratos aumenta sua absorvância e a outra metade ainda diminui. Indicando que o nutriente do extrato está chegando ao limite de seu aproveitamento. Por isto, não se pode atribuir este aumento de absorvância à maior multiplicação bacteriana.

Após 24 horas, a absorvância dos extratos variou de 1,19 (P23b) a 1,46 (P61v) (Tabela 16). No entanto, a absorvância do meio LPG + bactéria foi de 0,31. É possível que a turbidez

inicial ainda esteja sobreestimando a absorvância devida à multiplicação bacteriana. Mas, observa-se que em relação com o período de 12 horas, há aumento da absorvância para todos os extratos, indicando a multiplicação bacteriana. Para eliminar, o efeito da turbidez inicial estimou-se a diferença entre as absorvâncias de 24h e 0h (Tabela 16). Desta forma, detectou-se que a única progênie que não estimula o aumento da população bacteriana é P46 com semente marrom (absorvância= 0,16), reduzindo em 38% a multiplicação bacteriana.

Observações semelhantes de aumento da população bacteriana em resposta a extratos vegetais antibióticos foram relatadas em outros estudos, como no caso de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* a 5% sobre RS (Silva *et al.* 2008). Em 48 horas após inoculação, os extratos não possuíram efeito inibitório contra a bactéria, porém, estimularam seu crescimento em meio líquido (Silva *et al.* 2008).

A absorvância do antibiótico Tetraciclina[®] + bactéria variou de 0,05 a 0,12 considerando as doses de 200, 240 e 300 mg L⁻¹ após 6, 12 e 24 horas de inoculação. No entanto, a absorvância da testemunha LPG + bactéria após 0, 6, 12 e 24 horas variou de 0,05 a 0,31, indicando que a Tetraciclina[®] é capaz de diminuir a multiplicação de RS (Tabela 16). Entretanto, a dose de 200 mg L⁻¹ demonstra ser a mais apropriada para controlar o isolado de RS filotipo II. Essa concentração reduziu a multiplicação bacteriana sem causar uma grande variação na turbidez do meio, como observado nas doses mais elevadas, que mostraram valores de absorvância mais altos. Isso sugere que a dose de 200 mg L⁻¹ é suficiente para controlar o crescimento da bactéria sem causar efeitos significativos.

A avaliação da eficácia do antibiótico pode variar dependendo do método de análise utilizado. Então, para avaliar o impacto real do tratamento, deve-se tomar como base a contagem 24h - 0h, como foi mostrado anteriormente. Nesse sentido, as doses de 200, 240 e 300 mg L⁻¹ inibiram o crescimento bacteriano em 97, 74 e 74%, respectivamente. No entanto, a contagem em Câmara de Neubauer das mesmas doses controlou em 99,95% (Tabela 12). A diferença nas observações entre os métodos pode ser explicada pelas alterações morfológicas nas células de RS quando há destruição celular causadas por antibióticos e metabólitos secundários, ocorrendo o vazamento de conteúdo para o meio, e a desintegração da parede celular e da membrana (Guo *et al.* 2021). As doses mais concentradas do antibiótico podem ter causado alterações mais significativas nas células bacterianas, potencializando o vazamento, o que teria influenciado na turbidez e na leitura do espectrofotômetro.

5.2.2.2 Testes com extratos de feijão-macuco a 0,5%

Os resultados dos testes com extratos de feijão-macuco a 0,5% indicam que houve diferença estatística entre os tratamentos (extratos + controles) para todos os períodos avaliados (Tabela 17). No início do teste (0 horas), a absorvância do meio LPG + bactéria foi de 0,05, indicando que a turbidez dos extratos era muito semelhante à da testemunha. Isso ocorreu devido à maior diluição do extrato em comparação com o teste anterior. Em seis horas, os extratos variaram de 0,05 (P14v, P15b, P20b, P46v e P61b) a 0,08 (P1b e P46m) (Tabela 18). No entanto, a absorvância da testemunha LPG + bactéria permaneceu em 0,05, o que indica que ainda não houve multiplicação bacteriana.

Tabela 17. Análise de variância da absorvância dos tratamentos de zero a 24 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 0,5%.

Fonte de variação	Quadrado médio		Coeficiente de variação (%)	Média
	Tratamento (GL= 21)	Erro (GL= 66)		
Tempo 0h	0,00071 **	0,000024	8,19	0,06
6h	0,00090 **	0,000046	10,83	0,06
12h	0,00168 **	0,000032	7,94	0,07
24h	0,78925 **	0,001681	5,31	0,77

** , * , ns. Significativo a $P < 0,01$, a $P < 0,05$ e não significativo respectivamente pelo teste F.
GL= Grau de liberdade

Tabela 18. Médias da absorvância dos tratamentos de zero a 24 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 0,5%.

Tratamento	0 hora	6 horas	12 horas	24 horas	24h - 0h
P1 bege	0,07 bc	0,08 bc	0,07 efg	1,09 bcd	1,02
P1 vermelho	0,10 a	0,09 b	0,08 cd	1,14 a	1,04
P5 bege	0,07 bcd	0,06 efg	0,06 jk	1,06 cd	0,99
P5 vermelho	0,06 defgh	0,07 de	0,06 ghij	1,12 bc	1,06
P14 bege	0,06 def	0,06 efg	0,07 efg	1,05 de	0,99
P14 vermelho	0,06 fghij	0,05 ghij	0,08 de	1,07 cd	1,01
P15 bege	0,05 jk	0,05 ghij	0,05 kl	0,53 i	0,48
P20 bege	0,04 m	0,05 ghij	0,06 hij	0,76 h	0,72
P23 bege	0,06 fghij	0,06 ghij	0,06 ijk	0,96 f	0,90
P23 vermelho	0,07 cde	0,07 def	0,07 fghi	1,09 bcd	1,02
P46 bege	0,06 fghij	0,06 ghij	0,07 fghi	0,99 ef	0,93
P46 vermelho	0,06 defg	0,05 ghij	0,09 cd	1,03 de	0,97
P46 marrom	0,07 cde	0,08 cd	0,09 c	1,03 de	0,96
P61 bege	0,05 k	0,05 ij	0,06 hijk	0,87 g	0,82
P61 vermelho	0,07 cde	0,06 fghi	0,07 efg	1,45 a	1,38
P64 bege	0,08 b	0,07 def	0,07 ef	1,04 de	0,96
Média dos extratos	0,06	0,06	0,07	1,05	0,98
Tetraciclina® 200 mg L ⁻¹	0,06 ghijk	0,05 hij	0,06 jk	0,06 kl	0,00
Tetraciclina® 240 mg L ⁻¹	0,05 hijk	0,09 b	0,11 b	0,12 k	0,07
Tetraciclina® 300 mg L ⁻¹	0,05 ijk	0,10 a	0,14 a	0,11 k	0,06
Meio LPG + bactéria	0,05 kl	0,05 j	0,07 fgh	0,31 j	0,26
Meio LPG sem bactéria	0,06 efg	0,05 ghij	0,06 jk	0,05 l	-0,01
Água esterilizada	0,04 lm	0,05 ij	0,05 l	0,04 l	0,00

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

Após 12 horas, a absorvância dos meios com extratos variou de 0,05 (P15b) a 0,09 (P46v e P46m) (Tabela 18). Nesse período, a absorvância do meio LPG + bactéria subiu para 0,07. Os valores das testemunhas continuaram estáveis, semelhantes aos observados em 0h. Apenas a progênie P15 bege teve uma absorvância menor do que o controle LPG + bactéria, o que sugere que essa progênie pode estar começando a controlar a multiplicação bacteriana.

Em 24 horas, todos os extratos apresentaram um aumento em sua turbidez, variando de 0,53 (P15b) a 1,45 (P61v). A absorvância do controle LPG + bactéria foi de 0,31, indicando que houve multiplicação bacteriana. Isso indica que os extratos de feijão-macuco promoveram a multiplicação celular. Da mesma forma, ao observar a diferença entre 24h e 0h, nota-se que a progênie P15 bege foi a que menos promoveu a multiplicação bacteriana, mas ainda não foi capaz de controlar totalmente essa bactéria. Esses resultados indicam que, embora alguns extratos tenham mostrado uma tendência a retardar a multiplicação bacteriana em relação ao controle, nenhum deles foi capaz de controlar completamente RS nesse período de teste. Portanto, a eficácia desses extratos como agentes antibacterianos pode não ser significativa.

Comparando os métodos da contagem de bactérias com a absorbância (24h - 0h), se observa que P61 vermelho controlou RS na Câmara de Neubauer (Tabela 14). Contrariamente, este mesmo extrato foi o que mais promoveu o aumento da absorbância. A diferença entre os resultados pode ser explicada pela possível produção de exopolissacarídeos (EPS) ou pela presença de restos de células em decomposição. Os EPS são produzidos pela célula e secretados para o meio como um mecanismo de defesa contra o ressecamento celular, estresses abióticos e a antibióticos (Saile *et al.* 1997; Seesuriyachan *et al.* 2012; Murthy e Srinivas 2015).

Para futuros testes que utilizem extratos vegetais, aconselha-se incluir um tratamento de controle que envolva apenas o extrato vegetal, sem a presença de bactérias, para identificar se a turbidez está sendo causada por processos de oxidação ou outras reações químicas nos extratos. Além disso, a utilização de técnicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência pode ser valiosa para identificar as alterações na membrana celular bacteriana e a produção de EPS (Zhang *et al.* 2022), proporcionando uma compreensão mais detalhada dos efeitos dos extratos vegetais sobre as bactérias. Essas abordagens complementares podem ajudar a esclarecer os mecanismos de interação entre os extratos de feijão-macuco e RS, permitindo um melhor entendimento de como esses extratos afetam o crescimento e a sobrevivência dessa bactéria.

5.2.3 Difusão em disco em meio sólido

5.2.3.1 Halos de inibição

Neste teste foi avaliada a atividade bactericida dos extratos de feijão-mauco na concentração de 5%. Os resultados mostraram halos de inibição e também a presença de halos de estímulo (Figura 17). Os halos de inibição sugerem que alguns componentes dos extratos podem ter propriedades antibacterianas que impedem o crescimento da bactéria. Por outro lado, a presença de halos de estímulo pode indicar que outros componentes dos extratos podem promover o crescimento bacteriano, como discutido anteriormente em relação à turbidez nos testes de espectrofotometria (Item 5.2.2).

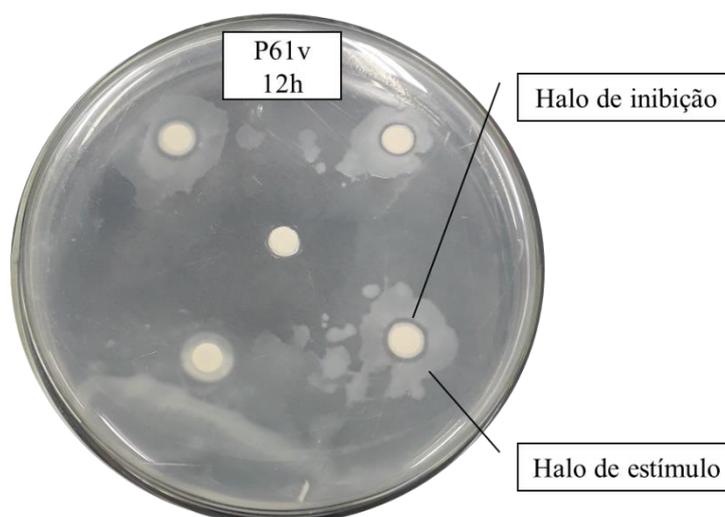


Figura 17. Halo de inibição e de estímulo de *Ralstonia solanacearum* proveniente da ação do extrato P61v em 12 horas. O disco central possui o tratamento controle de antibiótico na dose de 300 mg L^{-1} .
Fonte: Autora 2022.

Em relação aos halos de inibição, observa-se que após 6 horas de cultivo, não houve atividade dos extratos e controles em termos de inibição ou estímulo. No entanto, houve diferença significativa após 12, 24 e 48 horas, para ambas (Tabela 19). Desta forma, avaliou-se a atividade dos extratos após 12 horas de cultivo. Também se observou que os coeficientes de variação foram elevados, indicando uma alta variabilidade nas observações dentro de cada repetição de cada tratamento. Isso pode ser devido a vários fatores, como variações nas condições de cultivo, na distribuição dos discos ou até mesmo na resposta da bactéria a esses extratos. Para obter resultados mais confiáveis, é aconselhável aumentar o número de repetições.

Tabela 19. Análise de variância dos halos de inibição e de estímulo bacteriano de *Ralstonia solanacearum* filotipo II em meio sólido de seis a 48 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 5%.

Fonte de variação	Quadrado médio		Coeficiente de variação (%)	Média (mm)
	Tratamento (GL= 21)	Erro (GL= 80)		
Inibição 6h	0	0		0
12h	1,83 **	0,27	105,73	0,49
24h	352,38 **	4,07	36,75	5,49
48h	81,38 **	7,35	112,32	2,41
Estímulo 6h	0	0		0
12h	4,03 **	0,32	51,94	1,10
24h	7,03 **	0,51	63,08	1,14
48h	27,37 **	2,19	87,07	1,70

**, *, ns. Significativo a $P < 0,01$, a $P < 0,05$ e não significativo respectivamente pelo teste F.
GL= Grau de liberdade

Tabela 20. Médias dos halos de inibição e estímulo bacteriano de *Ralstonia solanacearum* filotipo II em meio sólido de 12 a 48 horas. Extratos de *Pachyrhizus* spp. a 5%.

Tratamento	Inibição (mm)			Estímulo (mm)		
	12 horas	24 horas	48 horas	12 horas	24 horas	48 horas
P1 bege	0 e	0 b	0 c	1,19 defg	2,08 bcde	2,2 bcde
P1 vermelho	0 e	0 b	0 c	1,37 bcdef	1,66 cde	3,74 bc
P5 bege	0,48 de	0 b	0 c	1,66 bcdef	2,3 bcd	6,3 a
P5 vermelho	0,34 de	0 b	0 c	1,29 cdef	2,15 bcde	2,45 bcde
P14 bege	0 e	0 b	0 c	1,01 efg	0 f	0 e
P14 vermelho	0 e	0 b	0 c	1,18 defg	0,99 ef	0 e
P15 bege	0,59 de	0 b	0 c	1,16 defg	2,69 bc	2,78 bcd
P20 bege	0 e	0 b	0 c	2,28 b	2,88 b	2,79 bcd
P23 bege	0 e	0 b	0 c	2,05 bcd	0 f	0 e
P23 vermelho	0 e	0 b	0 c	2,15 bc	1,58 cde	0 e
P46 bege	0 e	0 b	0 c	1,66 bcdef	2,04 bcde	3,84 b
P46 vermelho	0 e	0 b	0 c	1,64 bcdef	1,6 cde	1,79 bcde
P46 marrom	0 e	0 b	0 c	0,35 gh	0 f	0 e
P61 bege	0 e	0 b	0 c	1,03 efg	1,45 de	8,08 a
P61 vermelho	1,45 abc	0 b	0 c	3,51 a	4,52 a	7,17 a
P64 bege	0,26 de	0 b	0 c	0,73 fgh	1,58 cde	0,77 de
Tetraciclina 200 mg/L	1,81 ab	19,62 a	3,65 c	0 h	0 f	0 e
Tetraciclina 240 mg/L	1,97 a	19,37 a	3,47 c	0 h	0 f	0 e
Tetraciclina 300 mg/L	0,81 cde	20,62 a	12,98 a	0 h	0 f	0 e
Controle na placa: 300 mg/L	1,05 bcd	17,84 a	9,21 b	0 h	0 f	0 e
Meio LPG + bactéria	0 e	0 b	0 c	1,8 bcde	1,44 de	1,41 cde
Água	0 e	0 b	0 c	1,89 bcde	0 f	0 e

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

Após 12 horas de incubação, observou-se que os extratos P5b, P5v, P15b, P61v e P64b apresentaram efeito inibitório contra RS e seus halos de inibição variaram de 0,26 (P64b) a 1,45 mm (P61v) (Tabela 20). Estes extratos possuem uma atividade bactericida que se manifesta após 12 horas de incubação. Isso indica que os componentes bioativos dos extratos podem ter uma ação mais lenta contra a bactéria, que se torna evidente após um período prolongado de exposição. Destacando-se o extrato P61v o qual inibiu em 79,5% o diâmetro do halo se comparado com a Tetracilina[®] 300 mg L⁻¹. No entanto, esse efeito de inibição não foi observado nas contagens em Câmara de Neubauer e na leitura da absorbância, sugerindo que diferentes métodos de avaliação podem fornecer resultados diferentes em relação à atividade antimicrobiana dos extratos.

O efeito inibitório dos extratos de feijão-macuco diminuiu após 12 horas, com a ausência de halos de inibição em 24 e 48 horas. Isso indica que a atividade antimicrobiana dos extratos não é duradoura, e a bactéria pode eventualmente se adaptar ou resistir aos componentes dos extratos. A ausência de inibição em 24 horas corrobora com os resultados encontrados no teste em Câmara de Neubauer e de absorbância (Tabela 12 e 16).

Utilizando este mesmo método e outros meios sólido, têm-se observado outras substâncias capazes de inibir RS. Por exemplo, usando difusão em disco observou-se que biofertilizantes à base de extratos cítricos apresentaram halos inibitórios de 1,5 a 6,9 mm após 24 horas (Motoyama *et al.* 2003). Extratos de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), catingueira (*Caesalpinea pyramidalis*) e mussambê (*Cleome hassleriana*) na concentração de 80 mg mL⁻¹ apresentaram halos inibitórios de 14,7, 15,2 e 16,8 mm, respectivamente, após 48 horas de incubação (Silva *et al.* 2020). Isso indica que o controle de RS seria mais favorável com outras substâncias, não parecendo relevante o uso de extratos de feijão-macuco.

Os resultados obtidos com o antibiótico Tetraciclina[®] demonstram que a eficácia desse antibiótico no controle de RS varia com a dose e o tempo de exposição. Em 12 horas, houve diferenças significativas na largura dos halos de inibição, com a dose de 240 mg mL⁻¹ apresentando o maior efeito inibitório (1,97 mm) (Tabela 20). No entanto, em 24 horas, os diâmetros dos halos aumentaram em todas as doses (19,37 a 20,61 mm) (Tabela 20), indicando que a Tetraciclina[®] manteve sua atividade, mas não houve diferenças significativas entre as doses. Isso indica que a dose de 240 mg mL⁻¹ foi eficaz em inibir o crescimento de RS após 12 horas e manteve essa atividade em 24 horas.

Em 48 horas, a dose de 300 mg mL⁻¹ apresentou o maior diâmetro do halo, indicando que essa dose possui uma atividade prolongada de até 48 horas contra RS. Mas, os diâmetros

foram menores do que os observados em 24 horas (3,47 a 12,98 mm). Isso indica que a máxima atividade deste antibiótico contra RS acontece em 24 horas.

5.2.3.2 Halos de estímulo

Os halos de estímulo foram observados depois dos halos de inibição (Figura 17). Os resultados mostraram que, após 12 horas, todos os extratos de feijão-macuco apresentaram halos de estímulo, variando em diâmetro de 0,35 mm (P46m) a 3,51 mm (P61v) (Tabela 20). Isso indica que esses extratos estimularam o crescimento de RS após 12 horas de incubação. No entanto, em 24 horas, a situação mudou, e alguns extratos não apresentaram mais halos de estímulo, enquanto outros continuaram estimulando o crescimento bacteriano. Os diâmetros dos halos de estímulo variaram de 0 mm (P14b, P23b e P46m) a 4,52 mm (P61v) (Tabela 20).

Em 48 horas, a maioria dos extratos ainda tinha a capacidade de estimular o crescimento bacteriano, com diâmetros de halos de estímulo variando de 0 mm a 7,17 mm (P61v). No entanto, alguns extratos, como P14b, P23b e P46m, não apresentaram halos de estímulo em 24 e 48 horas. Esses resultados indicam que os extratos de feijão-macuco têm a capacidade de tanto estimular quanto inibir o crescimento de RS. Portanto, a eficácia desses extratos no controle de RS pode ser influenciada por vários fatores, incluindo o tempo de exposição e possivelmente da concentração de nutrientes e antinutrientes presentes nos extratos.

Para obter uma compreensão mais completa desses resultados, seria importante investigar quais compostos específicos nos extratos estão associados aos efeitos de inibição e estímulo. Além disso, ajustar as condições experimentais para reduzir a variabilidade e aumentar o número de repetições pode ajudar a obter resultados mais consistentes. Como mencionado, os resultados variaram entre os diferentes métodos de avaliação (difusão em disco, contagem em Câmara de Neubauer e leitura da absorbância). Essa variação pode ser atribuída às diferenças nas condições de teste e na sensibilidade dos métodos. Cada método pode detectar aspectos diferentes da atividade antimicrobiana, o que destaca a importância de usar abordagens complementares para avaliar a bioatividade de extratos vegetais.

As recomendações para trabalhos futuros incluem testar os extratos de feijão-macuco na concentração de 0,5% usando o método de difusão em disco. Além disso, é importante realizar ensaios biológicos para avaliar a ação dos extratos em diferentes isolados de RS devido à variabilidade genética que pode ocorrer nessa espécie bacteriana. A observação do halo de estímulo no controle meio LPG + bactéria pode ser resultado do acúmulo da bactéria presente na placa mais o disco embebido com extrato.

Para evitar falsos halos de estímulo, é aconselhável utilizar água esterilizada como tratamento controle nos testes de difusão em disco. Também é importante ajustar a quantidade de solução padronizada usada para espalhar nos discos. Utilizar apenas 0,5 mL de solução padronizada em uma placa de 90 mm é recomendado, pois o uso de 1,0 mL pode causar o escoamento da solução e interferir nos resultados de outros discos. Essas práticas ajudarão a obter resultados mais precisos nos testes de difusão em disco.

5.3 Etapa III. Seleção de progênies pelo Índice Mulamba e Mock (1978)

Nesta etapa, as progênies foram classificadas conforme seu desempenho nos testes de produtividade de sementes (Etapa I), de potencial bactericida (Etapa II) e de potencial fungicida (dados de De Lima *et al.* 2021). No teste de potencial bactericida, os dados do teste em Câmara de Neubauer com os extratos de feijão-macuco a 0,5% foram considerados em ordem crescente, uma vez que menores valores estão associados à ação inibitória contra as bactérias. Já para os testes de produtividade de sementes e potencial fungicida, os dados foram considerados em ordem decrescente, uma vez que maiores valores indicam maior produtividade e maior inibição da multiplicação bacteriana.

Os resultados da classificação das progênies são apresentados na Tabela 21, onde é possível observar as posições de cada progênie em cada teste. A menor soma de posições indica a progênie mais promissora de acordo com o Índice Mulamba e Mock (1978). Neste caso, as progênies P23 (soma= 5) e P14 (soma= 7) foram as que apresentaram as menores somas e, portanto, foram consideradas as mais promissoras. A progênie P23 se destacou ao estar entre as três primeiras classificações em todos os testes. Esse índice permitiu a seleção simultânea de progênies com bom desempenho em produtividade e eficiência bactericida e fungicida.

Tabela 21. Seleção de progênies pelo índice Mulamba e Mock (1978).

Teste	Progênies								
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°
Produtividade de sementes (t ha ⁻¹)	P23	P20	P14	P1	P61	P64	P15	P46	P5
Potencial bactericida ¹	P14	P20	P23	P61	P64	P15	P46	P5	P1
Potencial fungicida ²	P23	P5	P14	P46	P15	P1	P64	P20	P61
Teste	Classificação								
	P1	P5	P14	P15	P20	P23	P46	P61	P64
Produtividade de sementes (t ha ⁻¹)	4°	9°	3°	7°	2°	1°	8°	5°	6°
Potencial bactericida ¹	9°	8°	1°	6°	2°	3°	7°	4°	5°
Potencial fungicida ²	6°	2°	3°	5°	8°	1°	4°	9°	7°
Soma de postos	19	19	7	18	12	5	19	18	18

¹Dados do teste na Câmara de Neubauer (0,5%) em 24h.

²Dados de De Lima *et al.* (2021).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de feijão-macuco demonstraram atividade de inibição bacteriana por até 12h. No entanto, outros extratos vegetais e substâncias podem apresentar propriedades antimicrobianas mais efetivas ou duradouras contra *Ralstonia solanacearum* (RS). A escolha da substância ou método de controle depende de vários fatores, incluindo disponibilidade, custo, eficácia, segurança ambiental e regulamentações locais. Portanto, é importante conduzir estudos comparativos detalhados para avaliar a eficácia de diferentes substâncias e métodos no controle de RS.

Os experimentos realizados destacaram que a concentração dos extratos desempenha um papel crucial em sua capacidade de inibir a multiplicação de RS. Por exemplo, concentrações de 0,5% foram mais eficazes do que 5% na inibição da multiplicação bacteriana. Essas observações ressaltam a necessidade de investigar mais a fundo os mecanismos dessas interações.

Para avaliar a eficiência dos extratos na multiplicação bacteriana, deve-se considerar que cada método de quantificação é afetado pelas características fisiológicas da bactéria e pela estabilidade do extrato. No caso de RS, o método mais adequado foi a difusão em disco.

A variabilidade genética das progênies de feijão-macuco desempenhou um papel importante na seleção das progênies mais promissoras, considerando várias características simultaneamente. Neste estudo, foi possível selecionar progênies com alta produtividade de sementes, elevada capacidade fungicida e moderada capacidade bactericida.

Portanto, este estudo enfatiza a importância da otimização das concentrações dos extratos, da seleção de progênies para sua produção em escala industrial e de sua eficiência no controle de diversas pragas e doenças, bem como da compreensão da complexa interação entre os extratos de feijão-macuco e os diferentes biovars de RS. O caminho para a aceitação por parte dos agricultores requer a fabricação de produtos à base de extratos ou de pó solúvel a preços acessíveis.

7. CONCLUSÕES

Não se conseguiu diferenciar a produtividade de sementes entre as progênies avaliadas. Para detectar diferenças significativas entre as progênies, recomenda-se utilizar parcelas com mais de quatro plantas.

Os métodos de avaliação da bioatividade em meio líquido, por contagem em Câmara de Neubauer e por absorvância, demonstraram que os extratos aquosos de sementes de *Pachyrhizus* spp. a 5%, após 24 horas, promovem a multiplicação de *R. solanacearum* filotipo II. No entanto, os extratos na concentração de 0,5% possuem, no geral, maior atividade bactericida.

O método de difusão em disco, com extratos na concentração de 5%, permite avaliar a atividade inibitória e estimulante dos extratos sobre *R. solanacearum*.

As progênies P23 e P14 são promissoras para sua produção e uso como biopesticida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abid, M.; Hrishikeshavan, H.J.; Asad, M. 2006. Pharmacological evaluation of *Pachyrrhizus erosus* (L) seeds for central nervous system depressant activity. *Indian journal of Physiology and Pharmacology*, 50: 143-151.
- Adegbola, P.Y.; Nestor, A.A.; Houessionon P.; Alokpai, N.; Hell, K.; Thiele, G.; et al. 2015. Socio-economic analysis of *Pachyrrhizus erosus* cultivation in Benin: profitability and cost function analysis. Conference Paper/ Presentation, International Association of Agricultural Economists (IAAE). 23p.
- Agaba, R.; Tukamuhabwa, P.; Rubaihayo, P.; Mwanga, R.O.M.; Ssenyonjo, A.; Ndirigwe, J.; Tumwegamire, S.; Grüneberg, W. 2017. Heritability, combining ability and inheritance of storage root dry matter in yam beans. *African Crop Science Journal*, 25: 83-95.
- Agaba, R.; Rubaihayo, P.; Tukamuhabwa, P.; Mwanga, R.O.; Tumwegamire, S.; Ndirigwe, J.; et al. 2021. Genetic variation and response to selection for storage root dry matter and associated traits in a population of yam bean (*Pachyrrhizus* spp.) interspecies crosses. *Euphytica*, 217: 1-12.
- Ahmed, F.E. 2001. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trends in Analytical Chemistry*, 20: 649-661.
- Allard, R.W. 1971. *Princípios do melhoramento genético das plantas*. Edgard Blucher, São Paulo. 381p.
- Alecio, M.R.; Fazolin, M.; Netto, R.A.C.; Catani, V.; Estrela, J.L.V.; Alves, S.B.; et al. 2010. Insecticide action of the extract of *Derris amazonica* Killip for *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Amazonica*, 40: 719-728.
- Alvares, C.A.; Stape, J.L., Sentelhas, P.C.; Gonçalves, J.D.M.; Sparovek, G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22: 711-728.
- Ascheri, J.L.R., Zamudio, L.H.B.; de Carvalho, C.W.P.; Arevalo, A.M.; Fontoura, L. M. 2014. Extraction and characterization of starch fractions of five phenotypes *Pachyrrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. *Food and Nutrition Sciences*, 5: 1875-1885.
- Badillo, V.; Castellanos, J.Z. 1998. Fijación simbiótica de nitrógeno bajo condiciones de campo en Jícama (*Pachyrrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi y *P. erosus* (L.) Urban). In: Sørensen, M.; Estrella, J.E.; Hamann, O.J.; Ríos Ruíz, S.A. (Eds.). *Proceedings of 2nd International Symposium on Tuberous Legumes*. MacKeenzie, Copenhagen. p.389-398.
- Balbin, I.O.; Delgado Vásquez, O.; Sorensen, M.; Kvist, L.P.; Mejía Carhuanca, K. 2005. *El cultivo de chuín: una alternativa para la seguridad alimentaria y recuperación de*

suelos degradados en la Amazonía peruana. 1ra ed. Editora Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Peru. 42p.

Balbin, I.O.; Sorensen, M.; Kvist, L.P.; Vasquez, O.D. 2007. Review of the *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. cultivar groups in Peru. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 151: 2-13.

Baptista, M.J.; Reis Junior, F.B.; Xavier, G.R.; Alcântara, C.; Oliveira, A.R.; Souza, R.B.; et al. 2007. Eficiência da solarização e biofumigação do solo no controle da murcha-bacteriana do tomateiro no campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 933-938.

Barbosa, J.D.A.; Ferreira, S.D.; Salvalaggio, A.C.; Costa, N.V.D.; Echer, M.D.M. 2018. Allelopathy of aqueous *Pachyrhizus erosus* L. extracts on *Euphorbia heterophylla* and *Bidens pilosa*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 48: 59-65.

Barrera-Necha, L.L.; Bautista-Banos, S.; Bravo-Luna, L.; García-Suárez, F.J.; Alavez-Solano, D.; Reyes-Chilpa, R. 2004. Antifungal activity of seed powders, extracts, and secondary metabolites of *erosus* L. against three postharvest fungi. *Mexican Journal of Phytopatology*, 22: 356-361.

Becker, W.F.; Wamser, A.F.; Feltrim, A.L.; Suzuki, A.; Santos, J.P.; Valmorbidia, J.; et al. 2016. *Sistema de produção integrada para o tomate tutorado em Santa Catarina*. 1ra ed. Editora Caxias, Florianópolis. 149p.

Béjar, E.; Reyes-Chilpa, R.; Jiménez-Estrada, M. 2000. Bioactive Compounds from Selected Plants used in the XVI Century Mexican Traditional Medicine. *Studies in Natural Products Chemistry*, 24: 799-844.

Birch, R.G.; Alvarez, A.M.; Patil, S.S. 1981. A bacterial leaf spot caused in yam bean by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Phytopathology*, 71: 1289-1293.

Borém, A.; Miranda, G.V. 2009. *Melhoramento de plantas*. 5ta ed. Editora UFV, Viçosa. 529p.

Borsoi, A.; Santos, P.R.R.; Taffarel, L.E.; Júnior, A.C.G. 2014. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. *Acta Iguazu*, 3: 86-100.

Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L.; Kelman, A. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 52: 726-730.

Cabizza, M.; Angioni, A.; Melis, M.; Cabras, M.; Tuberoso, C.V.; Cabras, P. 2004. Rotenone and rotenoids in cube resins, formulations, and residues on olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 288-293.

Cabras, P.; Cabone, P.; Cabras, M.; Angioni, A.; Russo, M. 2002. Rotenone residues on olives and in olive oil. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50: 2576-2580.

Cardoso, I.C.; Pereira, H.M.G.; Tappin, M.R.R.; Behrens, M.D.D.D. 2017. Influência da técnica de extração e do tamanho de partícula do material vegetal no teor de compostos fenólicos totais da tintura das folhas de *Alpinia zerumbet*. *Revista Fitos*, 1: 62-68.

Carvalho, A.A.; Santos, L.R.D.; Freitas, J.S.D.; Chaves, M.H. 2020. Isoflavonoides da tribo Dalbergieae: Uma contribuição quimiosistemática para a subfamília Papilionoideae. *Química Nova*, 43: 1294-1311.

Castellanos, J.Z.; Zapata, F.; Badillo, V.; Pena-Cabriales, J.J.; Jensen, E.S.; Heredia-García, E. 1997. Symbiotic nitrogen fixation and yield of *Pachyrhizus erosus* (L.) cultivars and *Pachyrhizus ahipa* (WEDD) parodi landraces as affected by flower pruning. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 973-981.

Castellanos-Ramos, J.Z.; Acosta-Gallegos, J.A.; Orozco, N.R.; Muñoz-Ramos, J.J. 2009. Biological nitrogen fixation and tuber yield of yam bean in central Mexico. *Agricultura Técnica en México*, 35: 277-283.

Castrique, E., 2004. Rotenone. (<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/rotenone/startpage.htm>). Acesso em 21 de junho de 2021.

Catteau, L.; Lautié, E.; Koné, O.; Coppée, M.; Hell, K.; Pomalegni, C.B.; et al. 2013. Degradation of rotenone in yam bean seeds (*Pachyrhizus* sp.) through food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 11173-11179.

Ceballos, H.; Sánchez, T.; Chávez, A.L.; Iglesias, C.; Debouck, D.; Mafla, G.; et al. 2006. Variation in crude protein content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 589-593.

Chaim, A.; Castro, V.L.S.S. 2003. Tecnologia de Aplicação de Agrotóxicos. In: Freire, F.C.O.; Cardoso, J.E.; Viana, F.M.P. (Eds.). *Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. p.571-624.

Chen, X.J.; Xu, H.H.; Yang, W.; Liu, S.Z. 2009. Research on the effect of photoprotectants on photostabilization of rotenone. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95: 93-100.

Coelho Netto, R.A.; Noda, H.; Boher, B. 2003. Agressividade de isolados de *Ralstonia solanacearum* provenientes de solanáceas no estado do Amazonas. *Summa Phytopathologica*, 29: 208-211.

Coelho Netto, R.A.; Pereira, B.G.; Noda, H.; Boher, B. 2004. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 29:17-23.

Coimbra, J.L.M.; Guidolin, A.F.; Carvalho, F.I.F.D.; Azevedo, R.D. 2000. Correlações canônicas: II-Análise do rendimento de grãos de feijão e seus componentes. *Ciência Rural*, 30: 31-35.

Corrêa, R.D.S. 2011. Toxicidade de extratos de timbós (*Derris* spp.) sobre *Tetranychus desertorum* (Acari: Tetranychidae) em folhas de pimentão. Tese de doutorado. Programa Multi-Institucional de Pesquisa e Pós-Graduação em Biotecnologia/ Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 72 p. (<http://tede.ufam.edu.br/handle/tede/3135>).

Costa, J.P.C.D.; Alves, S.D.M.; Bélo, M. 1999. Teores de rotenona em Clones de Timbó (*Derris* spp. Fabaceae) de diferentes regiões da Amazônia e os seus efeitos na emergência de Imagos em *Musca Domestica* L. *Acta Amazônica*, 29: 563-573.

Crombie, L.; Whiting, D.A. 1998. Review article number 135 biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. *Phytochemistry*, 49: 1479-1507.

Cruz, C.D.; Regazzi, A.J. 2004. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Editora UFV, Viçosa. 480p.

Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.S. 2006. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 2da ed. Editora UFV, Viçosa. 585p.

D'Andrea, A.; Aliboni, A.; De Santis, A.; Mariani, S.; Gorgoglione, D.; Ritieni, A. 2007. SFE of *Derris elliptica* (Wallich) Benth. roots: Influence of process parameters on yield and purity of rotenone. *The Journal of Supercritical Fluids*, 42: 330-333.

Damayanti, T.A.; Susilo, D.; Nurlaelah, S.; Sartiami, D.; Okuno, T.; Mise, K. 2008. First report of Bean common mosaic virus in yam bean [*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban] in Indonesia. *Journal of General Plant Pathology*, 74: 438-442.

De Castro, M.L.; Garcia-Ayuso, L.E. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369: 1-10.

Delaney, M.A.; Sikora, E.J.; Delaney, D.P.; Palm, M.E.; Roscoe, J.; Haudenshield, J.S.; et al. 2011. First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* on *Pachyrhizus erosus* in the United States. *Plant Disease*, 95: 1034-1034.

Delêtre, M.; Soengas, B.; Vidaurre, P.J.; Meneses, R.I.; Delgado Vásquez, O.; Oré Balbín, I.; et al. 2017. Ecotypic differentiation under farmers' selection: Molecular insights into the domestication of *Pachyrhizus* Rich. ex DC. (Fabaceae) in the Peruvian Andes. *Evolutionary Applications*, 10: 498-513.

De Lima, R.G.; Ticoná-Benavente, C.E.A.; da Silva Filho, D. F.; e Silva, L.S.; Guimarães, R.G.V.; Hanada, R.E. 2021. *Pachyrhizus* spp. seed extracts control the *Sclerotium rolfsii* Sacc. mycelial growth. *Journal of Medicinal Plants Research*, 15: 289-296.

De Wilde, A.; Heyndrickx, A.; Carton, D. 1986. A Case of Fatal Rotenone Poisoning in a Child. *Journal of Forensic Sciences*, 31: 1492-1498.

Duke, J.A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York & London. 354p.

EPPO. 2021. European and Mediterranean Plant Protection Organization Global Database. (<https://gd.eppo.int/>). Acesso em 28 de junho de 2021.

Estrella, J.; Phillips, S.; Abbott, R.; Gillies, A.; Sørensen, M. 1998. Genetic variation and relationships in agronomically important species of Yam Bean (*Pachyrhizus* DC.) based on RAPD markers. In: Sørensen, M.; Estrella, J.E.; Hamann, O.J.; Ruiz, S.A.R. (Eds.). *Proceedings of Second International Symposium on Tuberous Legumes*. KVL, Copenhagen. p.43-59.

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.

Fegan, M.; Prior, P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A.C. (Eds.). *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. 1 ed. APS Press, Saint Lucia. p.449-461.

Fernandez, M.V.; Warid, W.A.; Loaiza, J.M.; Agustin, M.C. 1997. Developmental patterns of jicama (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban) plant and the chemical constituents of roots grown in Sonora, Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition*, 50: 279-286.

Galbieri, R.; Inomoto, M.M.; da Silva, R.A. 2015. Manejo de nematoides na cultura do algodoeiro em Mato Grosso. Embrapa Agropecuária Oeste/ Embrapa Agricultura Ocidental. 11p.

GBIF. 2021. Global Biodiversity Information Facility. (<https://www.gbif.org/>). Acesso em 14 de maio de 2021.

Genin S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist*, 187: 920-928.

Genin, S.; Boucher, C. 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology*, 3: 111-118.

George, R.D.; Finn, K.G.; Sparagano, O. 2014. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasit Vectors*, 7: 1-12.

Guimarães, R.G.V.; Ticona-Benavente, C.A. 2017. Extratos de jacatupé (*Pachyrhizus* spp.) controlam *Sclerotium rolfsii* no cubiu. Resumo Expandido, Anais do VI Congresso de iniciação científica do INPA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 4p.

Guinaz, M.; Milagres, R.C.R.M.; Pinheiro-Sant'Ana, H.M.; Chaves, J.B.P. 2009. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Química Nova*, 32: 2098-2103.

Guo, Y.; Fan, Z.; Yi, X.; Zhang, Y.; Khan, R.A.A.; Zhou, Z. 2021. Sustainable Management of Soil-Borne Bacterium *Ralstonia solanacearum* In Vitro and In Vivo through Fungal Metabolites of Different *Trichoderma* spp. *Sustainability*, 13: 1-14.

Grum, M. 1994. Breeding of new yam bean (*Pachyrhizus* Rich. ex DC.) cultivars in Tonga involving interspecific hybrids. In: Sørensen, M. (Eds.). *Proceedings of the First International Symposium on Tuberous Legumes*. Jordbrugsforlaget, Copenhagen. p.315-320.

Grüneberg, W.J.; Goffman, F.D.; Velasco, L. 1999. Characterization of yam bean (*Pachyrhizus* spp.) seeds as potential sources of high palmitic acid oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76: 1309-1312.

Grüneberg, W.J.; Freynhagen-Leopold, P.; Delgado-Vázquez O. 2003. A new yam bean (*Pachyrhizus* spp.) interspecific hybrid. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 757-766.

Grüneberg, W.J. 2016. *Enhancing the nutrient-rich yam bean (Pachyrhizus spp.) storage roots to improve food quality and availability and sustainability of farming systems in Central and West Africa*. International Potato Center, Lima. 272p.

Hayes, W.J.; Laws, E.R. 1991. *Handbook of Pesticide Toxicology: Classes of Pesticides*. 1st ed. Academic Press, San Diego. 1576p.

Hayward, A.C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward, A.C.; Hartman, G.L. (Eds.). *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford. p.123-135.

Hazel, L.N. 1943. The genetics basics for constructing selections indexes. *Genetics*, 28: 476-490.

Heider, B.; Tumwegamire, S.; Tukamuhabwa, P.; Ndirigwe, J.; Bouwe, G.; Bararyenya, A. 2011. Nutritional improvement of yam bean and sustainability of farming systems in Central and West Africa. *African Crop Science*, 10: 93-95.

Heredia, G.E. 1994. Observación de materiales segregantes y evaluación de germoplasma de jícama (*Pachyrhizus* Rich. ex DC.) en Mexico. In: Sørensen, M. (Eds.).

Proceedings of the First International Symposium on Tuberous Legumes. Jordbrugsforlaget, Copenhagen. p.273-282.

Hounyèvou, A.K.; Ahounou, J.L.; Houssou, A.P.; Fandohan, P.; Aihou, K.; Adjanooun, A.; et al. 2013. Yam bean (*Pachyrhizus erosus*) tuber processing in Benin: production and evaluation of the quality of yam bean-gari and yam bean-fortified gari. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7: 247-259.

Huachua, W.G.; Chávez, A.R. 2014. Ficha técnica del cultivo de Ashipa o Chuin. Ficha Técnica, Ministerio de Agricultura y Riego, Instituto Nacional de Innovación Agraria, Programa Nacional de Innovación en Recursos Genéticos. 8p. (<https://repositorio.midagri.gob.pe/handle/20.500.13036/452>). Acesso em 05 de agosto de 2022.

Huang, C.F.; Hsu, C.J.; Liu, S.H.; Lin-Shiau, S.Y. 2008. Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: Oxidative stress and down-regulated Na⁺/K⁺-ATPase involved. *Toxicology Letters*, 176: 188-197.

Ildis. 2006. Database of Legumes. International Legume Database and Information Service. (<https://ildis.org>). Acesso em 07 de maio de 2022.

Isman, M.B. 2008. Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64: 8-11.

Isman, M.B. 2020. Botanical insecticides in the twenty-first century - fulfilling their promise? *Annual Review of Entomology*, 65: 233-249.

Jardim, I.C.S.F. 2010. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica*, 2: 13-25.

Kale, P.R. 2006. *Studies on nutritional and processing properties of storage roots of different yam bean (Pachyrhizus spp.) and wild mung bean (Vigna vexillata) species*. Cuvillier Verlag, Göttingen. 133p.

Kim, S.K.; Choi, H.J.; Won, J.H.; Park, J.H.; Lee, I.J.; Park, S.Y. 2009. Introduction of yam bean (*Pachyrhizus* spp.) in Korea. *Korean Journal of Plant Resources*, 22: 546-551.

Kisambira, A.; Muyonga, J.H.; Byaruhanga, Y.B.; Tukamuhabwa, P.; Tumwegamire, S.; Grüneberg, W.J. 2015. Composition and functional properties of yam bean (*Pachyrhizus* spp.) seed flour. *Food and Nutrition Sciences*, 6: 736-746.

Kpêmoua, K.; Boher, B., Nicole, M.; Colatayud, P; Gêger, J.P. 1996. Cytochemistry of defense response in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihots*. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 1131-1143.

Krisnawati, A.; Sutrisno, S.; Adie, M.M. 2018. Diversity in Tuber Characteristics of Local Cultivars of Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*) in Indonesia. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 10: 267-274.

Kurozawa, C.; Pavan, M.A. 1997. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Eds.). *Manual de Fitopatologia*. Agronômica Ceres, São Paulo. p.642-670.

Lackhan, N.K. 1994. *Investigations on in vitro production of rotenone using Pachyrhizus erosus (L.) Urban*. Dissertação de Mestrado. University of the West Indies, Estados Unidos, 115p. (<https://uwispace.sta.uwi.edu/dspace/handle/2139/2047?show=full>).

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.; Rasse, C.; Rozet, E.; Mourgues, C.; Vanhelleputte, J.P.; Quetin-Leclercq, J. 2013a. Fast microwave-assisted extraction of rotenone for its quantification in seeds of yam bean (*Pachyrhizus* sp.). *Journal of separation science*, 36: 758-763.

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

Léon, J. 2000. *Botánica de los cultivos tropicales*. 3rd ed. Servicio Editorial IICA, San Jose. 522p.

Leonel, M. 2007. Analysis of the shape and size of starch grains from different botanical species. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27: 579-588.

Leterme, P.; Buldgen, A.; Estrada, F.; Londoño, A.M. 2006. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. *Food Chemistry*, 95: 644-652.

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.

Lopes, C.A. 2015. Bacterial Wilt - A threatening disease of tomato cultivated under warm temperatures. Embrapa Hortaliças, Brasília. 4p.

Lopes, C.A.; Santos, J.R.M. 1994. Doenças do tomateiro. Embrapa Hortaliças, Brasília. 67p.

Lopes, R.M.; Oliveira, T.D.; Nagem, T.J. Pinto, A.D.S. 2010. Flavonóides. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, 3: 18-22.

Lukitaningsih, E.; Holzgrabe, U. 2014. Bioactive compounds in bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) as antioxidant and tyrosinase inhibition agents. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 25: 68-75.

Lukitaningsih, E.; Holzgrabe, U. 2019. New Compound (8,9) -Furanyl-Pterocarpan-3-OI Used for Standardization of Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) Extract as Sunscreen and Skin Whitening Agent. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 10: 60-70.

Mahalle, R.M.; Dhole, R.; Pallial, S. 2019. Spotted Pod Borer, *Maruca vitrata* (Fabricius): A Threat to Pulses in India. *Popular Kheti*, 7: 34-36.

Mandal, V.; Mohan, Y.; Hemalatha, S. 2007. Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1: 7-18.

Martínez, M. 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas*. 3ra ed. Fondo de Cultura Económica. 1220p.

Martins, A.K.B.; Ticona-Benavente, C.A. 2018. Extratos de jacatupé (*Pachyrhizus* spp.) no controle de *Ralstonia solanacearum*. Anais do VII Congresso de iniciação científica do INPA/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 4p.

Mascaro, U.C.P.; Rodrigues, L.A.; Bastos, J.K.; Santos, E.; Costa, J.P. 1998. Valores de DL50 em peixes e no rato tratados com pó de raízes de *Derris* spp e suas implicações ecotoxicológicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 18: 53-56.

Matthysse, J.G.; Schwardt, H.H. 1943. Substitutes for Rotenone in Cattle Louse Control. *Journal of Economic Entomology*, 36: 718-720.

Medeiros, J.; Kanis, A.L. 2010. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20: 796-802.

Melo, Z.L.; Bueno, C.R. 2000. Desenvolvimento de feijão-macuco em área de várzea. *Horticultura Brasileira*, 18: 9-15.

Menezes, E.L.A. 2005. *Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola*. 1ra ed. Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro. 58p.

Monteiro, J.M.; Albuquerque, U.P.D.; Araújo, E.D.L.; Amorim, E.L.C.D. 2005. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, 28: 892-896.

Moscardi, F.; Bueno, A.F.; Sosa-Gómez, D.R.; Roggia, S.; Hoffmann-Campo, C.B.; Pomari, A.F.; et al. 2012. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo, C.B.; Corrêa-Ferreira, B.S.; Moscardi, F. (Eds.). *Soja Manejo integrado de insetos e outros Artrópodes-praga*. Embrapa Soja, Brasília. p.213-334.

Motoyama, M.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Fiori, A.C.G.; Scapim, C.A. 2003. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Acta Scientiarum*, 25: 509-512.

MSD. 2021. Manual MSD: Ingestão diária recomendada de vitaminas. (https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/multimedia/table/v2089461_pt). Acesso em 12 de agosto de 2021.

Mulamba, N.N.; Mock, J.J. 1978. Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egypt Journal of Genetics and Cytology*, 7: 40-51.

Murthy, K.N.; Srinivas, C. 2015. Extraction and characterization of extracellular polysaccharide from *Ralstonia solanacearum* causing wilt of tomato. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 5: 81-92.

Narongchai, P.; Narongchai, S.; Thampituk, S. 2005. The first fatal case of yam bean and rotenone toxicity in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 88: 984-986.

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.

Noda, H.; Machado, F.M. 1997. Feijão-macuco (*Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng.). In: Cardoso, M.A. (Eds.). *Hortaliças não-convencionais da Amazônia*. 1ra ed. Embrapa, Brasília. 152p.

Noda, H.; Paiva, W.O.; Bueno, C.R. 1984. Hortaliças da Amazônia. *Ciência Hoje*, 3: 32-37.

Noelli, F.S. 1994. El Guaraní agricultor. *Revista Paraguaya de Reflexión y Diálogo*, 144: 17-20.

Noman, A.S.M.; Hoque, M.A.; Haque, M.M.; Pervin, F.; Karim, M.R. 2007. Nutritional and anti-nutritional components in *Pachyrhizus erosus* L. tuber. *Food chemistry*, 102: 1112-1118.

Nurrochmad, A.; Leviana, F.; Wulancarsari, C.G.; Lukitaningsih, E. 2010. Phytoestrogens of *Pachyrhizus erosus* prevent bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *International Journal of Phytomedicine*, 2: 363-372.

Oliveira, L.A.D.; Vidor, C. 1984. Colonização, sobrevivência e competitividade de estirpes de *Rhizobium japonicum*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 8: 57-62.

OMM. 2022. Organização Meteorológica Mundial. Dados de temperatura e precipitação de Manaus. (<https://worldweather.wmo.int/en/city.html?cityId=1073>). Acesso em 13 de setembro de 2022.

Ong, E.S. 2004. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Journal of Chromatography B*, 812: 23-33.

Ørting, B.; Grüneberg, W.; Sørensen, M. 1996. Ahipa, (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi) in Bolivia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43: 435-446.

Patel, F. 2011. Pesticidal suicide: adult fatal rotenone poisoning. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 18: 340-342.

Peckolt, G. 1922. Jacatupé. *Chácaras e Quintais*, 25: 275-276.

Pereira, G.S.; Noelli, F.S.; Campos, J.B.; Santos, M.P.; Zocche, J.J. 2016. Ecologia histórica guarani: as plantas utilizadas no bioma Mata Atlântica do litoral sul de Santa Catarina, Brasil (parte 1). *Cadernos do LEPAARQ (UFPEL)*, 13: 197-246.

Phillips-Mora, W.; Morera, J.; Sorensen, M. 1993. *Las jícamas silvestres y cultivadas (Pachyrhizus spp.)*. Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza (CATIE), Turrialba. 83p.

Phrutivorapongkul, A.; Lipipun, V.; Ruangrunsi, N.; Watanabe, T.; Ishikawa, T. 2002. Studies on the constituents of seeds of *Pachyrrhizus erosus* and their anti herpes simplex virus (HSV) activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50: 534-537.

Prior, P.; Ailloud, F.; Dalsing, B.L.; Remenant, B.; Sanchez, B.; Allen, C. 2016. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics*, 17: 1-11.

Prior, P.; Fegan, M. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticulture*, 695: 127-136.

PubChem. 2021. Coleção de informações químicas. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Acesso em 21 de julho de 2021.

Ramalho, M.A.P.; Abreu, Â.F.B.; Santos, J.B.; Nunes, J.A.R. 2012. *Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas*. 1ra ed. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 522p.

Ramos-de-la-Peña, A.M.; Renard, C.M.; Wicker, L.; Contreras-Esquivel, J.C. 2013. Advances and perspectives of *Pachyrhizus* spp. in food science and biotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, 29: 44-54.

Reddy, P.P. 2015. Yam bean, *Pachyrhizus erosus*. In: Reddy, P.P. (Eds.). *Plant protection in tropical root and tuber crops*. Springer, New Delhi. p.267-280.

Ribeiro, W.G.; Noda, H.; Soares, J.E.C.; Rocha, M.Q. 2011. Avaliação das características agrônômicas de feijão-macuco. *Horticultura Brasileira*, 29: s2902-s2908.

Rocha, D.J.A.; Moura, A.B. 2013. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. *Tropical Plant Pathology*, 38: 423-430.

Rodrigues, F.; Pimenta, V.; Braga, K.M.; Araújo, E. 2016. Obtenção de extratos de plantas do cerrado. *Enciclopédia Biosfera*, 13: 870-887.

Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M.; Temprano, F.; Santamaria, C.; Leidi, E.O. 2009. Assessment of nitrogen fixation potential in ahipa (*Pachyrhizus ahipa*) and its effect on root and seed yield. *Experimental Agriculture*, 45: 177-188.

Rossato, M. 2016. Espécies de *Ralstonia* no Brasil: caracterização fenotípica, molecular, novas fontes de resistência em tomateiro e patogenicidade em cafeeiro. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, Brasil, 165p. (https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/22440/1/2016_Maur%C3%ADcioRossato.pdf).

Roychowdhury, R.; Datta, S.; Gupta P.; Jagatpati, T. 2012 Analysis of genetic parameters on mutant populations of mungbean (*Vigna radiata* L.) after ethyl methane sulphonate treatment. *Notulae Scientia Biologicae*, 4: 137-143.

Sae-Yun, A.; Ovatlarnporn, C.; Itharat, A.; Wiwattanapatapee, R. 2006. Extraction of rotenone from *Derris elliptica* and *Derris malaccensis* by pressurized liquid extraction compared with maceration. *Journal of Chromatography A*, 1125: 172-176.

Safni, I.; Cleenwerck, I.; De Vos, P.; Fegan, M.; Sly, L. Kappler, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 3087-3103.

Saile, E.; McGarvey, J.A.; Schell, M.A.; Denny, T.P. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 87: 1264-1271.

Salanoubat, M.; Genin, S.; Artiguenave, F.; Gouzy, J.; Mangenot, S.; Arlat, M. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 415: 497-502.

Santayana, M., Rossel, G., Núñez, J.; Sørensen, M.; Delêtre, M.; Robles, R.; et al. 2014. Molecular Characterization of Cultivated Species of the Genus *Pachyrhizus* Rich. ex DC. by AFLP Markers: Calling for More Data. *Tropical Plant Biology*, 7: 121-132.

Santiago, T.R.; Lopes, C.A.; Caetano-Anollés, G.; Mizubuti, E.S.G. 2017. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. *Plant Pathology*, 66: 383-392.

Santos, A.C.O.; Cavalcanti, M.S.M.; Coelho, L.C.B.B. 1996. Chemical composition and nutritional potential of yam bean seeds (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Plant Foods for Human Nutrition*, 49: 35-41.

SAS Institute Inc. 2013. Base SAS[®] 9.4 Procedures Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Scramin, S. 1994. Estudo fitoquímico do gênero *Pachyrhizus* Rich. ex DC. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 170p. (<https://hdl.handle.net/20.500.12733/1581758>).

Seesuriyachan, P.; Kuntiya, A.; Hanmoungjai, P.; Techapun, C.; Chaiyaso, T.; Leksawasdi, N. 2012. Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76: 912-917.

SiBBr. 2021. Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. (<https://sibbr.gov.br/>). Acesso em 01 de fevereiro de 2021.

Sieuwerts, S.; De Bok, F.A.; Mols, E.; De Vos, W.M.; van Hylckama Vlieg, J.E.T. 2008. A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 275-278.

Shimizu, J.Y.; Kageyama, P.Y.; Higa, A.R. 1982. Procedimentos e recomendações para estudos de progênies de essências florestais. Embrapa Florestas/ Unidade Regional de Pesquisa Florestal Centro-Sul, Curitiba. 33p.

Schuler, F.; Casida, J.E. 2001. The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest management science*, 57: 932-940.

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

Silva, E.S.D. 2019. Interação genótipo x ambiente de componentes agronômicos e físico químicos de feijão-macuco (*Pachyrhizus* spp.) em terra firme e várzea na região metropolitana de Manaus-AM. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical/

Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 93 p.
(<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1123384>).

Silva, R.F.; Pascholati, S.F.; Bedendo, I.P. 2008. Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. *Summa Phytopathologica*, 34: 137-144.

Silva Filho, D.F.; Noda, H.; Paiva, W.O.; Yuyama, K.; Bueno, C.R.; Machado, F.M. 1997. Hortaliças não convencionais nativas e introduzidas na Amazônia. In: Noda, H.; Souza, L.A.G.; Fonseca, O.J.M. (Eds.). *Dois décadas de contribuições do INPA à Pesquisa Agrônoma no Trópico Úmido*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Ministério da Ciência e Tecnologia, Manaus. p.19-58.

Silva, R.M.D.; Santos, W.S.D.; Lima, E.J.D.; Pinto, K.M.S. 2020. Extratos aquosos de plantas nativas com potencial uso no manejo da murcha bacteriana do tomateiro *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, 7: 1271-1282.

Silva, T.M. e; Guimarães, R.G.V.; Martins, A.K.; Silva Filho, D.F.; Ticona-Benavente, C.A. 2023. *Pachyrhizus* toxicity: Genetic variability of mature and immature seeds and its effects on *Sclerotium rolfsii* and *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 17: 8-15.

Singer, T.P.; Ramsay, R.R. 1994. The reaction sites of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1187: 198-202.

Smith, H.F. 1936. A discriminant function for plant selection. *Annual of Human Genetics*, 7: 240-250.

Sørensen, M. 1990. *Observations on distribution, ecology and cultivation of the tuber-bearing, legume genus Pachyrhizus Rich. ex DC.* 1st ed. Wageningen Agricultural University Papers, Frederiksberg. 38p.

Sørensen, M. 1996. *Yam bean (Pachyrhizus DC.) - Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.* 2nd. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 143p.

Sørensen, M.; Grüneberg, W. J.; Ørting, B. 1997a. Ahipa (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi). In: Hermann, M.; J. Heller. (Eds.). 1997a. *Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon*. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome. p.13-73.

Sørensen, M.; Doygaard, S.; Estrela, J.; Kvist, L.; Nielsen, P. 1997b. Status of the South American Tuberous legume (*Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng.). *Biodiversity and Conservation*, 6: 1581-1625.

Stamford, N.P.; Moura, A.M.M.F.; Santos, K.S.; Santos, P.R. 2004. Atuação de *Acidithiobacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizus erosus*). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28: 75-83.

Stamford, N.P.; Santos, C.E.D.R.; Medeiros, R.; Freitas, A.D.S.D. 1999. Efeito da fertilização com fósforo, potássio e magnésio em jacatupé infectado com rizóbio em um Latossolo Álico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 1831-1838.

Sun, A.; Chi, X.; Yang, X.; Feng, J.; Li, Y.; Zhou, J. 2019. Applications and Prospects of Ultrasound-Assisted Extraction in Chinese Herbal Medicine. *Open Access Journal of Biomedical Science*, 1: 5-15.

Tapia, C.; Sørensen, M. 2003. Morphological characterization of the genetic variation existing in a Neotropical collection of yam bean, *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 681-692.

Teixeira, D.H.L.; Oliveira, M.S.P.; Gonçalves, F.M.A.; Nunes, J.A.R. 2012. Índices de seleção no aprimoramento simultâneo dos componentes da produção de frutos em açazeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47: 237-243.

Trindade, L.C. da; Coelho, M.V.S.; Marques, A.D.A. 2003. Crestamento bacteriano aureolado do feijoeiro: praga quarentenária para o Brasil com alto risco de disseminação no país. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. 10p.

Upegui, Y.; Quiñones, J.G.W.; Torres F.; Escobar G.; Robledo S.; Echeverri, F. 2014. Preparation of rotenone derivatives and in vitro analysis of their antimalarial, antileishmanial and selective cytotoxic activities. *Molecules*, 19: 18911-18922.

Urbina, M. 1906. Raices comestibles entre los antiguos mexicanos. In: Urbina, M. (Eds.). *Xicama*. Imprenta del Museo Nacional. p.123-125.

Vasconcelos, E.M.D.; Silva Filho, D.F.D.; Silva, E.S.D.; Benavente, C.A.T. 2018. Caracterização físico-química de acessos do banco de germoplasma de feijão-macuco (*Pachyrhizus* Rich. ex DC. spp.) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. *Revista RG News*, 4: 21-30.

Vasse, J.; Frey, P.; Trigalet, A. 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8: 241-251.

Villar, M.L.D. 1991. Conteúdo endógeno de rotenona e pachyrhizina em *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. Tese de doutorado. Instituto de Biologia/ Universidade de Campinas, Brasil, 109p. (<https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/35264>).

Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303-313.

Wiesbrook, M.L. 2004. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides. *Illinois Pesticide Review*, 17: 1-8.

Williams, J.S. 1962. The evaluation of a selection index. *Biometrics*, 18: 375-393.

Wu, Y.; Wang, X.; Fan, E. 2012. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of puerarin and total isoflavones from *Puerariae Lobatae Radix* (*Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi) with response surface methodology. *Phytochemical Analysis*, 23: 513-519.

Yu, J.H.; Huang, C.F.; Wang, T.H.; Hung, D.Z.; Mu, H.W.; Pan, C.S. 2020. Oxidative storm in a patient with acute rotenone-containing plant poisoning. *The American Journal of Emergency Medicine*. 38: 1296e1-1296e3.

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.

Zanklan, A.S.; Becker, H.C.; Sørensen, M.; Pawelzik, E.; Grüneberg, W.J. 2018. Genetic diversity in cultivated yam bean (*Pachyrhizus* spp.) evaluated through multivariate analysis of morphological and agronomic traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65: 811-843.

Zhang, P.; Qin, D.; Chen, J.; Zhang, Z. 2020. Plants in the genus *Tephrosia*: Valuable Resources for Botanical Insecticides. *Insects*, 11: 1-18.

Zhang, L.; Qin, M.; Yin, J.; Liu, X.; Zhou, J.; Zhu, Y.; Liu, Y. 2022. Antibacterial activity and mechanism of ginger extract against *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Applied Microbiology*, 133: 2642-2654.

Zubairi, S.I.; Sarmidi, M.R.; Aziz, R.A. 2015. A preliminary study on mosquito larvicidal efficacy of rotenone extracted from malaysia *Derris* sp. *Jurnal Teknologi*, 76: 275-279.

Zubairi, S.I.; Othman, Z.S.; Sarmidi, M.R.; Aziz, R.A. 2016. Environmental friendly bio-pesticide Rotenone extracted from *Derris* sp.: A review on the extraction method, toxicity and field effectiveness. *Jurnal Teknologi*, 78: 47-69.

10. ANEXO A - Análise de solo da Estação Experimental Alejo Von Der Pahlen 2021.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Laboratório de Solos (DEAS/FCA)

Nome/Empresa: Rândrea Graziella Verçosa

Data: 11/0/2021

CPF/CNPJ:

Endereço: Estação Experimental km 14

Área cultivada:

Cultura: Feijão

Amostra: km 14

Análise Química			
Variáveis	Unidades	Valor	Classe ^a
pH - Acidez ativa (CaCl ₂)	-	4,80	Alta
H+Al - Acidez potencial (SMP)	cmol _c dm ⁻³	1,82	Baixa
Al - Alumínio (KCl)	cmol _c dm ⁻³	0,00	Muito Baixo
Ca - Cálcio (KCl)	cmol _c dm ⁻³	2,80	Bom
Mg - Magnésio (KCl)	cmol _c dm ⁻³	0,40	Baixo
K - Potássio (Mehlich-1)	mg dm ⁻³	22,00	Baixo
P - Fósforo (Mehlich-1)	mg dm ⁻³	168,00	-
MO - Matéria orgânica (colorimetria)	dag kg ⁻¹	-	-
SB - Soma de bases	cmol _c dm ⁻³	3,30	Médio
T - Cap. de troca de cátions a pH 7	cmol _c dm ⁻³	5,12	Médio
t - Cap. de troca de cátions efetiva	cmol _c dm ⁻³	3,30	Médio
V - Saturação por bases	%	64,45	Bom
m - Saturação por alumínio	%	0,00	Muito Baixa
S - SO ₄ ²⁻ (Enxofre) (fosfato de cálcio)	mg dm ⁻³	-	-
B - (Boro) (água quente)	mg dm ⁻³	-	-
pHSMP - (tampão SMP)	-	6,80	
Na - (Sódio)	mg dm ⁻³	9,00	
CE - (Condutividade elétrica)	dS m ⁻¹		
Prem - Fósforo remanescente	mg kg ⁻¹		

Análise Física	
Umidade Atual (%)	%
Densidade	g cm ⁻³
Areia (%)	%
Silte (%)	%
Argila (%)	%
Textura ^b	

MA = muito argilosa; AG = argilosa; M = Média; S = Siltosa; AR = Arenosa

Vitor José Repolho Rabelo
CRQ-AM: 1400159
Químico Responsável

Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Octávio Jordão Ramos, 3000, CEP: 69077-000, Coroado, Manaus, AM, –
Minicampus, FCA/DEAS, Bloco 02, 2o andar, Laboratório de Solos - tel: 3305-1181 R-2110, solos@ufam.edu.br

^a As classes de interpretação e metodologias de pH, S e B seguem Raij et al., (1997). As demais classes de interpretação, exceto CE, seguem Ribeiro et al., (1999). ^b A classe textural segue o Sistema Brasileiro de Classificação do Solo (EMBRAPA, 2006). **As classes de interpretação são gerais, sem levar em consideração o tipo de solo, o clima, a cultura e o manejo (Ribeiro et al., 1999). CONSULTE SEMPRE UM ESPECIALISTA.** REFERÊNCIAS: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. Sistema brasileiro de classificação de Solos. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2006. 306 p. RIBEIRO, A.C., GUMARÃES, P.T.G., ALVAREZ V., V.H. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5. Aproximação. Viçosa : CFSEMG, 1999. RAIJ, B. van et al. (Ed.). Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2.ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1996. (IAC. Boletim Técnico, 100).