



**Universidade Federal do Tocantins
Campus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

RONICE ALVES VELOSO

**ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONTROLE ALTERNATIVO DE
FITOPATÓGENOS**

**GURUPI - TO
2016**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

RONICE ALVES VELOSO

ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONTROLE ALTERNATIVO DE FITOPATÓGENOS

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi

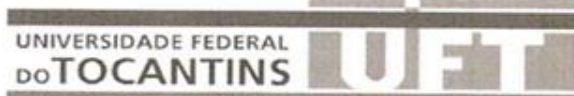
V443 Veloso, Ronice Alves.
Óleos essenciais como controle alternativo de fitopatógenos. / Ronice Alves
Veloso. – Gurupi, TO, 2016.
140 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário
de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Produção Vegetal, 2016.
Orientador: Gil Rodrigues dos Santos

1. Sanity and pathogenicity of basil seed mycoflora and Curvularia spot control using essential oils.
2. Preventive and curative control of Curvularia spot in basil plants using essential oil of citronella
grass. 3. Composição química e bioatividade do óleo essencial de frutos de Morinda citrifolia L. 4.
Óleo essencial de Morinda citrifolia L. como substância elicitadora na síntese de enzimas indutoras de
resistência de doenças em plantas de milho. I. Título

CDD 635

**TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer
meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é
crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal**



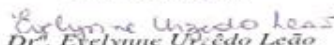
Universidade Federal do Tocantins
Campus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

Defesa nº

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE
RONICE ALVES VELOSO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO TOCANTINS**

Aos 25 dias do mês de maio do ano de 2016, às 09:00 horas, na Sala de 15 do Prédio Bala II, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Gil Rodrigues dos Santos do Campus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis do Campus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins, Dr^a Evelynne Urzêdo Leão do Campus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães do Departamento de Ciências Naturais/Universidade Federal de São João Del Rei, Prof. Dr. Ildon Rodrigues do Nascimento do Campus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de Ronice Alves Veloso, intitulada "Óleos Essenciais como controle alternativo de fitopatógenos". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, habilitando-o (a) ao título de Doutora em Produção Vegetal. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis
Primeiro examinador


Dr^a Evelynne Urzêdo Leão
Segundo examinador

Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães
Terceiro examinador


Dr. Ildon Rodrigues do Nascimento
Quarto examinador


Dr. Gil Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Tocantins
Orientador e presidente da banca examinadora

Gurupi, 25 de Maio de 2016.


Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

A Deus onipotente, onipresente e onisciente
A minha querida e amada avó Ana Curcino
da Silva (*in memoriam*)

Aos meus pais, Romulo Soares Veloso e
Zenilde Alves Veloso por todo o esforço,
empenho e compreensão por esta trajetória;
ao meu irmão Clarismunde Alves Veloso
(*in memoriam*) e as minhas irmãs Ana
Luiza e Débora pelo companheirismo e
cumplicidade, aos meus sobrinhos Danilo,
Romulo Neto, Cristhyan e Flávio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, onipresente, onisciente e onipotente. Mestre de tudo que sou...

A meus pais Romulo Soares Veloso e Zenilde Alves Veloso pelo apoio, compreensão, dedicação e companheirismo constante nos momentos de dificuldades, conquistas e alegrias.

Ao meu irmão Clarismunde Alves Veloso (*in memoriam*) por sempre ter representado força e determinação na busca por meus objetivos.

As minhas irmãs Ana Luiza Alves Veloso e Débora Alves Veloso, pelo carinho e cumplicidade; Aos meus sobrinhos Danilo Alves Veloso, Romulo Soares Veloso Neto, Crysthian Alves de Castro e Flavio Veloso por sempre estarem na torcida pelo meu sucesso.

Aos meus cunhados Jovano e Pedro que são como irmãos que a minhas irmãs presentearam-me.

A toda minha família pela confiança e amor dedicados a mim.

Aos meus amigos de sempre (irmão do peito) Susana Cristine, Sergio Alves, Elcione Lima, Ariadila Gonçalves, Príncila Pâmela, Frances Nunes, Irais Dolores, Aline Torquato, Ana Maria Córdova, Marilene Ramos.

Aos amigos do Laboratório de fitopatologia: Dalmácia, Jaíza, Mateus, João Vinicius, Rosângela, Evelynne, Patrícia, Priscila, Pedro, Vanilza que além, de uma incrível equipe de pesquisa, são como uma verdadeira família.

Aos alunos de graduação que me acompanharam no início do projeto de doutorado: Allan, Helen, Gustavo e Micaele.

A prof^a. Talita Ferreira pela amizade, carinho, parceria e conhecimento transmitidos para o andamento e conclusão do projeto. E também a sua família, esposo prof. Chrystian Siqueira e os filhos Nicole e Nicholas, por tê-la disponibilizado aos fins de semana e feriados para que acompanhasse a execução das atividades de pesquisa.

Ao prof. Dr. Ezequiel Silva por sanar algumas dúvidas na execução da pesquisa.

Ao prof. Dr. Luiz Gustavo Guimarães pelas análises químicas dos óleos essenciais, contribuindo com o andamento da pesquisa.

Ao prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos pelo carinho, amizade, atenção, dedicação e orientação para o bom andamento das atividades de pesquisa, e por aceitar-me em sua equipe, permitindo assim, que eu pudesse concluir esta trajetória.

Aos professores da Universidade Federal do Tocantins que contribuíram com minha formação profissional desde a graduação, e demonstram um grande carinho e amizade que extrapolam os portões da instituição.

Ao programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, representado na pessoa do prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis, pela disponibilidade e empenho em atender-me sempre que necessitei a ele recorrer. Muito obrigada prof. Rodrigo por todo apoio e confiança em mim depositada, possibilitando mais esta conquista em minha carreira profissional.

E também sou muitíssimo agradecida à Érika Menezes, que para alguns pode parecer apenas o cumprimento de sua função, mas a atenção e o carinho com o qual sempre recebe os alunos, demonstra bem mais que a profissional competente, como também a pessoa incrível que é. Sou muito grata pelo carinho e atenção com o qual sempre fui recebida na secretaria do programa de Pós Graduação em Produção Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

À Universidade Federal do Tocantins e todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu alcançasse mais esta vitória.

Muito obrigada!!!

RESUMO GERAL

No presente estudo, foram avaliados o potencial dos óleos essenciais das espécies *Cymbopogon nardus* L. (Capim citronela), *Copaifera* sp. (Copaíba) e *Ocimum basilicum* L. (Manjeriçã) no controle de fitopatógenos associados a sementes comercializadas de manjeriçã; também foi determinada a composição química do óleo essencial de *Morinda citrifolia* L. (Noni) e sua atividade fungitóxica *in vitro* e *in vivo* no controle de fitopatógenos causadores de helmintosporiose, bem como seu potencial na indução de síntese de fitoalexinas e enzimas envolvidas nos mecanismos resistência a doenças e defesa em plantas de milho. Devido à complexidade da composição química dos óleos essenciais, tais substâncias têm apresentado potencial promissor no controle de agentes fitopatogênicos. Observou-se que os óleos essenciais apresentam potencial de inibição da micoflora associada às sementes de *O. basilicum*, e o óleo essencial de *C. nardus* foi eficiente no controle *in vitro* inibindo a germinação de conídios e o crescimento micelial do fitopatógeno *Curvularia* sp., além de ter sido também, eficaz no controle preventivo da mancha de *Curvularia* em plantas de *O. basilicum*. Apesar de não haver informações quanto a utilização do óleo essencial de frutos de *M. citrifolia* no controle de fitopatógenos, os resultados demonstraram que o óleo essencial desta espécie foi eficiente na inibição do crescimento micelial e na severidade da doença helmintosporiose do milho causada pelos fitopatógenos *Bipolaris maydis* e *Exserohilum turcicum*, apresentando valores de ACPD inferiores aos valores observados quando as plantas foram pulverizadas com fungicida. Também observou-se que o óleo essencial apresentou potencial na síntese de fitoalexinas envolvidas nos mecanismos de resistência e defesa vegetal em plantas de milho.

Palavras chaves: Controle biológico, Enzimas antioxidativas, Fitoalexinas, Fungitoxicidade.

GENERAL ABSTRACT

At the present study we evaluated the potential of essential oils of species *Cymbopogon Nardus* L. (Citronella grass), *Copaifera* sp. (Copaiba) and *Ocimum basilicum* L. (Basil) in control phytopathogens associated seeds marketed of *O. basilicum*; the essential oil chemical composition of *Morinda citrifolia* L. (Noni) and its fungitoxic activity *in vitro* and *in vivo* in control of phytopathogens causers of leaf blotch, as well as the its potential for phytoalexin synthesis and enzymes induction involved in the mechanisms disease resistance and defense in maize plants. Due to the complexity of the chemical composition of essential oils, such substances have presented promising potential in the control of pathogenic agents. Observed that essential oils presented potential for inhibition of mycoflora associated to *O. basilicum* seeds, and the essential oil of *C. nardus* was effective *in vitro* control inhibiting spore germination and mycelial growth of the phytopathogen *Curvularia* sp., besides having been also, effective in the preventive control of *Curvularia* spot disease in *O. basilicum* plants. Although there is no information about the use of essential oil of *M. citrifolia* fruits on the control of phytopathogens, the results showed that the essential oil of this species was effective in inhibiting the mycelial growth and the blotch severity of disease caused by phytopathogens *Bipolaris maydis* and *Exserohilum turcicum*, presenting AUDPC values lower than those observed when plants were sprayed with fungicides. It was also observed that the essential oil presented potential in phytoalexin and enzymes synthesis involved in resistance and defense mechanisms in maize plants.

Keywords: Biological control, antioxidative enzymes, Phytoalexins, Fungitoxicity.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO I.....	14
<i>SANITY AND PATHOGENICITY OF BASIL SEED MYCOFLORA AND CURVULARIA SPOT CONTROL USING ESSENTIAL OILS</i>	15
SUMMARY.....	15
INTRODUCTION.....	17
MATERIAL AND METHODS.....	18
RESULTS.....	22
DISCUSSION.....	28
REFERENCES.....	30
CAPITULO II.....	34
<i>COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FRUTOS DE Morinda citrifolia L.</i>	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	49
CAPITULO III.....	52
<i>ÓLEO ESSENCIAL DE Morinda citrifolia L. COMO SUBSTÂNCIA ELICITORA NA SÍNTESE DE ENZIMAS INDUTORAS DE RESISTÊNCIA DE DOENÇAS EM PLANTAS DE MILHO</i>	53
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72

INTRODUÇÃO GERAL

Preocupações com o uso indiscriminado de pesticidas na produção de alimentos tem despertado o interesse das instituições de pesquisas quanto à utilização de produtos à base de extratos e óleos essenciais provenientes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares no controle de doenças em plantas cultivadas (SOYLU et al., 2010; ISMAN et al., 2011).

Pesquisas têm demonstrado que as plantas medicinais são fontes promissoras de moléculas com aplicações nos mais diversos ramos das ciências. Tais moléculas são produto do metabolismo secundário das plantas, sintetizadas em sua grande maioria, com função de defesa vegetal. Como produto do metabolismo secundário, os óleos essenciais são misturas complexas formadas por compostos orgânicos, voláteis e aromáticos que conferem o odor característico as plantas medicinais. Ao longo de décadas, os princípios ativos de origem natural contribuíram para o desenvolvimento de novos fármacos utilizados atualmente em práticas clínicas (DE ARAÚJO et al., 2011).

O controle de doenças utilizando óleos essenciais, envolvem mecanismos de ação direta promovendo danos irreversíveis às estruturas fúngicas, comprometendo sua integridade celular (RASOOLI et al., 2006), bem como a ativação de mecanismos de defesa da própria planta, induzindo a síntese de enzimas antioxidativas. Dentre as enzimas, destacam-se a síntese de Superóxido Dismutase (SOD), Ascorbato Peroxidase (APX), Catalase (CAT), Peroxidases (POX) e quitinase (QUI) (GILL e TUTEJA, 2010; BETTINI et al., 2014).

A aplicação de óleos essenciais como fungicidas pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio, que funcionam como importantes sinalizadores local e sistêmicos. Em contrapartida, as células vegetais sintetizam enzimas antioxidativas para controlar os níveis de espécies reativas de oxigênio. As alterações na atividade enzimática das plantas permitem acompanhar o estado de indução de resistência, quando expostas às condições de estresse. Uma cadeia de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em conjunto com sistemas de reparação celular formam uma complexa defesa contra o estresse oxidativo e regula a sinalização de estresse (DEMIDCHIK, 2015).

Severo estresse ambiental imposto aos tecidos vegetais induz mudanças no metabolismo de oxigênio (O_2) que causam o estresse oxidativo. Tal estresse ocorre quando espécies reativas de oxigênio não são rapidamente eliminadas e a taxa de reparação de componentes celulares danificados não consegue manter o ritmo com a taxa de danos. A persistência dessa situação, pode levar a danos irreversíveis com perda das competências fisiológicas e eventual morte celular. No entanto, a produção de espécies reativas de oxigênio, resultantes de tensões ambientais moderadas, dentro da gama adaptativa da planta, tem importantes funções como sinalizadores. Nestas

circunstâncias, a produção de espécies reativas de oxigênio induzem mecanismos de defesa que protegem a planta sem resultar em estresse oxidativo (MULLINEAUX e BAKER, 2010).

Ativadores de defesa vegetal, com significativa participação na indução de resistência são livremente comercializados, como por exemplo, Bion/Actigard (acibenzolar S-metil), Messenger (proteína harpina oriunda de *Erwinia amylovora*), Elexa® (derivado de quitina – quitosana), Milsana® (extrato de folhas de *Reynoutria sachalinensis* - Polygonaceae), Oxycom® (Componente A – ácido peracético, ácido acético e peróxido de hidrogênio; componente B – mix de nutrientes e ácido salicílico) e Phytogard® (fosfito de potássio), entre outros (PASCHOLATI e LEITE, 1994; BARROS et al., 2010). No entanto, devido à complexidade da composição química dos óleos essenciais, estes podem também apresentar potencial de defesa vegetal atuando tanto, diretamente na estrutura de fitopatógenos, quanto induzindo a síntese de enzimas antioxidativas na planta, representando um importante indutor de resistência à doenças.

Neste contexto, o presente arquivo de tese foi elaborado em formato de artigo científico dividida em três capítulos. O primeiro capítulo intitulado “Sanity and pathogenicity of basil seed mycoflora and *Curvularia* spot control using essential oils” com o objetivo de analisar o transporte, patogenicidade e transmissão de fungos patogênicos associados a sementes de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), o efeito fungitóxico de óleos essenciais em tais microrganismos e o controle de mancha de *Curvularia* usando óleo essencial, foi redigido segundo as normas da revista *Journal of Plant Pathology*. O segundo capítulo intitulado “Composição química e bioatividade do óleo essencial de *Morinda citrifolia* L.” com o objetivo de avaliar o potencial do óleo essencial de frutos maduros de *M. citrifolia* na inibição do crescimento micelial de fitopatógenos isolados de plantas de milho. E o terceiro capítulo intitulado “Óleo essencial de *Morinda citrifolia* L. como substância elicitora na síntese de enzimas associadas à indução de resistência às doenças em plantas de milho” com o objetivo de verificar o potencial do óleo essencial de frutos maduros de *M. citrifolia* na indução de síntese de fitoalexinas e enzimas de resistência às doenças em plantas de milho.

REFERÊNCIAS

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

BETTINI, M.O.; COSCOLIN, R.B.S.; BRESSAN, D.F.; GOMES, E.R.; BROETTO, F. Enzimas antioxidativas em tecidos vegetais. *In*: BROETTO, F. (Coordenador). **Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas**. Botucatu: IBB/UNESP, Cultura Acadêmica, p. 23-28, 2014.

DE ARAÚJO, D.A.M.; FREITAS, C.; CRUZ, J.S. Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology. **Life sciences**, v.89, n.15, p.540-544, 2011.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v.109, p.212-228, 2015.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

ISMAN, M.B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, v.10, n.2, p.197-204, 2011.

MULLINEAUX, P.M.; BAKER, N.R. Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant Physiology*, v.154, n.2, p.521-525, 2010.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p.1-51, 1994.

RASOOLI, I.; REZAEI, M.B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, v.17, n.5, p.359-364, 2006.

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, n.3, p.183-189, 2010.

CAPÍTULO I

SANITY AND PATHOGENICITY OF BASIL SEED MYCOFLORA AND CURVULARIA SPOT CONTROL USING ESSENTIAL OILS

SANITY AND PATHOGENICITY OF BASIL SEED MYCOFLORA AND *CURVULARIA* SPOT CONTROL USING ESSENTIAL OILS

Submitted to: *Journal of Plant Pathology* (JPP)

SUMMARY

The scarce application of phytosanitary control measures to medicinal species makes their seeds important vehicles for the pathogenic microorganisms spread. Thus, the aim of this study was to analyze the transport, pathogenicity and transmission of pathogenic fungi associated with basil seeds; the fungitoxic effect of essential oils in the respective associated microorganisms, and *Curvularia* spot control using essential oils. Characteristics evaluated sanity and seed germination, the inhibition of mycoflora of basil seeds with essential oils using a blotter test method, the mycoflora pathogenicity, mycelial growth inhibition and *in vivo* control of *Curvularia* spot with the use of citronella grass (*Cymbopogon nardus*) essential oil. Were identified 13 genera of fungi, some causing leaf spots, such as *Curvularia*, *Colletotrichum*, and *Alternaria*. Other genera, such as *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Rhizopus*, among others, were considered storage contaminant fungi. *In vitro* tests with the citronella grass and basil essential oils demonstrated a significant effect in phytopathogens control. The citronella grass essential oil, although it was not effective as a curative control measure, demonstrated effectiveness when applied preventively against *Curvularia* spot in basil plants. Thus, it demonstrated its potential as a botanical fungicide.

Keywords: *Cymbopogon nardus* L., *Ocimum basilicum* L., Botanical fungicide, Leaf spots, Fungitoxicity

SANIDADE E PATOGENICIDADE DE MICOFLORA DE SEMENTES DE MANJERICÃO E CONTROLE DE MANCHA DE CURVULARIA UTILIZANDO ÓLEOS ESSENCIAIS

RESUMO

A aplicação escassa de medidas de controle fitossanitários para espécies medicinais torna suas sementes importantes veículos de propagação de microorganismos patogênicos. Assim, o objetivo do estudo foi analisar o transporte, patogenicidade e transmissão de fungos patogênicos associados às sementes de manjericão; o efeito fungicida dos óleos essenciais nos respectivos microorganismos associados, e controle de mancha de curvularia usando óleos essenciais. As características avaliadas foram a sanidade e germinação das sementes, a inibição da microbiota fúngica das sementes de manjericão com óleos essenciais usando um método do papel de filtro, a patogenicidade de microbiota fúngica, inibição do crescimento micelial e no controle *in vivo* da mancha de curvularia com o uso de óleo essência de capim citronela (*Cymbopogon nardus*). Foram identificados 13 gêneros de fungos, alguns causadores de manchas foliares, como *Curvularia*, *Colletotrichum*, e *Alternaria*. Outros gêneros, tais como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, entre outros, foram considerados fungos contaminantes de armazenamento. Testes *in vitro* com óleo essencial de capim citronela e manjericão demonstraram efeito significativo no controle de fitopatógenos. O óleo essencial de capim citronela, embora não tenha sido eficaz como medida de controle curativo, demonstrou eficácia quando aplicado de forma preventiva contra mancha de curvularia em plantas de manjericão, demonstrando assim seu potencial como um fungicida botânico.

Palavras-chave: *Cymbopogon nardus* L., *Ocimum basilicum* L., fungicidas Botânico, manchas foliares, Fungitoxicidade

INTRODUCTION

The diseases control in medicinal, condiments, and aromatic plants is not a simple activity to be performed. The use of pesticides may compromise the production and chemical composition of the active ingredients of economic interest (Russomanno *et al.*, 2010). Thus, diseases management in these species should take place, preferably with the use of resistant cultivars as well as seeds, seedlings, and propagative materials free of any pathogens (Kruppa and Russomanno, 2011).

The phytosanitary diseases control in medicinal plants in Brazil is not performed in a rigorous manner, the seeds represent an important vehicle for the pathogens spread (Reis *et al.*, 2007; Kruppa and Russomanno, 2008). An alternative control has been the use of healthy seeds with high vigor from reputable suppliers. Thus, the pathogenic organisms introduction into new growth areas is avoided (Russomanno and Kruppa, 2010; Kruppa and Russomanno, 2011).

The application of natural substances in phytopathogens control has been extensively studied over the last decades, and the use of vegetable extracts and essential oils has been shown to be effective at phytopathogens control (Pereira *et al.*, 2006; Camatti-Sartori *et al.*, 2011). Essential oils are mixture of compounds of complex structures synthesized from the secondary metabolism of some plant species. They consist of volatile elements in various plant organs and are related to necessary functions for vegetal survival; playing a fundamental role in their defense against microorganisms and predators (Ribeiro *et al.*, 2012; Ootani *et al.*, 2013). To present fungitoxic properties, essential oils can be used in phytopathogens control in crops of economic interest (Garcia *et al.*, 2012; Sarmiento-Brum *et al.*, 2013).

Basil (*Ocimum basilicum* L.) is an herbaceous and aromatic plant belonging to the Lamiaceae family, and it is native to Southeast Asia and Central Africa (Blank *et al.*, 2010). Introduced in Brazil by Italian colonists, basil has adapted well to Brazilian climatic conditions and can be grown throughout the year. Research has shown that basil essential oil has insecticidal, repellent, and antimicrobial properties and is used in grains conservation (Fernandes *et al.*, 2004; Flávio *et al.*, 2014). As phytopathological problems, there are a few basil diseases that can lead the leaves to turn brown or yellow, have spots or even wilt and fall off, and the control is generally recommended with the use of healthy seeds.

Studies assessing the sanitary quality, well as, disease control in medicinal plants are scarce. Given this, the present study aimed analyze the transport, pathogenicity and transmission of pathogenic fungi associated with basil seeds; the fungitoxic effect of essential oils in the respective associated microorganisms, and *Curvularia* spot control using essential oils.

MATERIAL AND METHODS

Basil seed samples

Basil seeds were acquired through local trade, with a germination percentage and purity of 85% and 100%, respectively. The seeds were preserved in original packaging, kept in a dry place at room temperature.

The essential oil of basil and citronella grass were obtained by hydrodistillation using Clevenger and vegetable oil of copaiba was extracted directly from the plant stem.

Sanity and seed germination

The seed sanity test was performed by blotter test method described by Brazil (2009). Briefly, the seeds were placed in transparent boxes (gearbox) lined with two sheets of paper filter previously sterilized and moistened with 10 mL of sterilized water. Two hundred basil seeds were deposited and divided into four replicates.

After seven days were performed a germination assessment of the presence and incidence of mycoflora associated with basil seeds. The fungi were identified with aid of a optical stereoscopic microscope, through observations and comparisons with structures described in the literature (Ellis, 1971; Barnett and Hunter, 1972).

After identification, the fungi were isolated in glass Petri plates with PDA culture medium (potato, dextrose and agar) and kept in an incubation chamber at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a photoperiod of 12 hours until use in a subsequent test.

Mycoflora control in basil seeds by essential oils

Bioassays were established in a completely randomized design in a factorial scheme of 3 x 10 (essential oils x essential oil concentrations), with four replicates. The treatments were (T1) = basil (*O. basilicum* L.), (T2) = citronella grass (*C. nardus* L.), and (T3) = copaiba (*Copaifera* sp.) essential oils. The concentrations used were 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, and 100% (v.v.).

The blotter test method was used, placed 200 seeds previously treated with 0.5 mL of aqueous solution containing the diluted essential oil with Tween 80 (1%). Then, the gearboxes were kept in an incubation chamber at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a 12-hour photoperiod. After seven days' incubation, with the aid of an optical stereoscopic microscope, was evaluated the fungal incidence and performed the identification as described earlier.

Mycoflora pathogenicity

The fungi identified previously were isolated in PDA culture medium and then inoculated in basil plants previously grown in pots, at 30 days after seeding, to check their pathogenicity.

Inoculation was performed through leaves spraying with 20 mL distilled water solution containing a concentration of 10^6 conidia·mL⁻¹. The control was sprayed with only distilled water. After inoculation, the plants were placed in a dark and moist chamber for 24 hours and then were kept at room conditions ($30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$), with daily irrigation and observations to diagnose the disease presence.

In order to fulfill the Koch's postulates, basil leaf fragments were submitted to aseptic procedures by 50% alcohol solution, 1% sodium hypochlorite, and three washings in sterilized distilled water. Then, leaf fragments were deposited in the center of glass Petri plates with PDA culture medium. Five Petri plates, for each identified gender, were prepared and kept in an incubation chamber at $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ for seven days. After the incubation period, was performed the isolate identification. After pathogenicity confirmation, we performed *in vitro* and *in vivo* biocontrol tests.

Effect of essential oils on *Curvularia* sp. *in vitro*

To deploy the *in vitro* biocontrol, the essential oil that showed the best efficacy control in the mycoflora test was selected. *In vitro* bioassays were established in a completely randomized design in a factorial scheme of 2 x 10 (essential oils x essential oil concentrations), with four replicates and five assessment times (2, 4, 6, 8, and 10 days after implantation). The essential oils used was from basil and citronella grass. The concentrations used were 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, and 50% v.v.

Different essential oil concentrations were prepared from a total solution volume of 0.5 mL. Distilled water, the solution volumes, and Tween 80 (1%) were placed in test tubes, adding the respective rates of essential oil and then homogenizing in a shaker. Then, 0.1 mL of the concentrations of each essential oil was spread on the surface of the PDA with the aid of a Drigalsky handle. In the center of each Petri plate was deposited a mycelium disc (4 mm) of *Curvularia* sp. isolate. The Petri plates were sealed and kept in the incubation chamber at $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ for ten days.

The evaluations were performed at regular intervals of 48 hours. We measure the colonies average diameter in two diametrically opposite directions. After that, we calculated the mycelial growth rate index (Maia *et al.*, 2011) and the percentage of mycelial growth inhibition (Edington *et al.*, 1971).

Effects of citronella grass essential oil concentration on conidia germination

The bioassay was installed in small vials in a completely randomized design with four replicates, testing the effect of different concentrations of citronella grass essential oils. The assessed concentrations were 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, and 5.0% v.v.

The conidial solution was prepared from three Petri plates with *Curvularia* sp. colonies. Ten mL of sterile distilled water was placed on each plate, and with a soft bristle brush, conidia were removed from the culture medium surface, and then was filtered with cheesecloth. The conidia count was performed on Neubauer chamber, adjusting the concentration to 10^6 conidia·mL⁻¹.

In small vials we deposited 0.05 mL of essential oil plus 0.05 mL of conidia solution, and kept in an incubation chamber at $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ for 12 hours. After this period, the spore count was performed by assessing 100 conidia germinated in each treatment, expressed in percentage of germinated conidia.

Growing plants for *in vivo* tests

Basil plants were grown in a 5-liter pot, using red-yellow oxisol as substrate and manure in the proportion of 2:1. Five plants were maintained in each pot. Daily irrigation was performed with the aid of a manual watering. At 20 days after seeding, we add seven g of NPK fertilizer (05-25-15) to each pot, and at 35 days after basil plant seeding, they were subjected to *in vivo* tests.

Phytotoxicity of citronella grass essential oil to basil plants

Five different citronella grass essential oil concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5% v.v.) were used. Two controls were used, one with application of distilled water and the other with distilled water plus Tween 80 (1%). Twenty milliliters of the essential oil solution was applied to the basil plants, using a manual sprayer. The plants were kept at $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 hours. Subsequently, were performed the phytotoxicity evaluation in the plants, using a rating scale adapted from (Dequech *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2009; Cogliatti *et al.*, 2011): 0% = phytotoxicity absence; 1 – 25% = mild leaves necrosis or mild chlorosis plant; 26 – 50% = moderate leaves necrosis or moderate plant chlorosis; 51 – 75% = high leaves necrosis or high plant chlorosis; 76 – 100% = wilt and plant dry.

Preventive and curative control of *Curvularia* spot

We used a completely randomized design with four replicates and five assessments times. Treatments consisted of three different essential oil concentrations (0.25, 0.50, 0.75% v.v.) and three controls (T0 = distilled water; T1 = distilled water and Tween 80 to 1%, and T3 = fungicide thiophanate methyl to 1000 ppm). The disease severity assessments were performed through a rating scale adopted by Santos *et al.* (2005) at regular intervals of 48 hours.

In the preventive control assay, the basil plants were sprayed with 20 mL of different essential oil concentrations using a manual sprayer. After two hours, we applied 20 mL of conidia solution (10^6 conidia·mL⁻¹) of *Curvularia* sp. isolate. Then, the plants were kept in a moist and dark chamber. After 24 hours the plants were carried to a natural environment in the shade ($30^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$). Daily irrigation was performed with the aid of a watering pot. Over ten days, the disease severity was assessed (Santos *et al.*, 2005).

In the curative control assay, 20 mL of conidia solution were inoculated on basil plants using a manual sprayer. Then the plants were kept in a moist and dark chamber for 48 hours. After the incubation period, the plants were placed in a natural environment, as previously described. As the first *Curvularia* spot characteristic lesions appeared, an assessment of disease severity was carried out (Santos *et al.*, 2005). After disease severity assessment, the application of different concentrations of essential oils was performed. The plants were kept under the same conditions previously described and the severity assessment was performed.

The statistical analyses of the data were conducted using the Sisvar statistical software (Ferreira, 2010). The qualitative means were grouping using the Tukey test ($p < 0.05$) and regression graphs were generate for quantitative ones.

RESULTS

Sanity and seed germination

Eight genera of fungi were identified in basil seeds; included *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., and *Curvularia* sp. that were pathogenic to basil plants. The other genera found were not pathogenic to the plants (Table 1). *Rhizopus* was the most dominant genera showed the highest incidence, with 24% of contaminated seeds. Regarding the physiological quality of the basil seed, it was observed that the germination was not affected by the fungi presence. The seed germination rate was 88%, as the same suggested in the package.

Table 1. Fungi incidence (%), pathogenicity and percentage of basil seeds (*Ocimum basilicum* L.) germination

Fungi	Incidence (%)	Pathogenicity
<i>Alternaria</i> sp.	1	+
<i>Aspergillus</i> sp.	3,5	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	2	+
<i>Cladosporium</i> sp.	6,5	-
<i>Curvularia</i> sp.	1,5	+
<i>Penicillium</i> sp.	1	-
<i>Rhizopus</i> sp.	24	-
Seeds Germination = 88%		

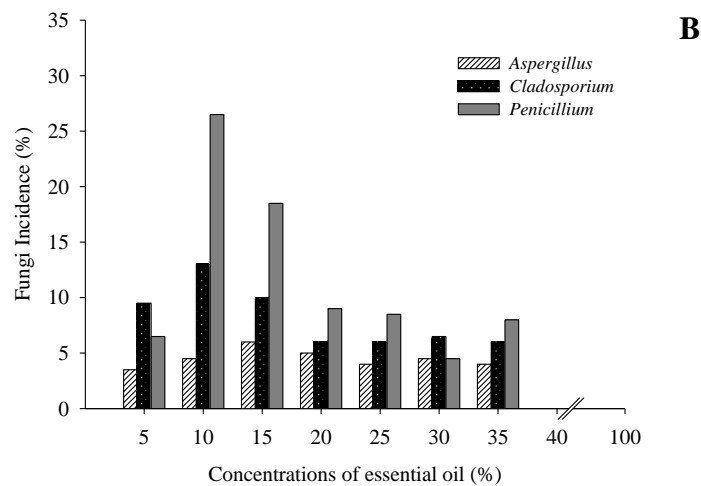
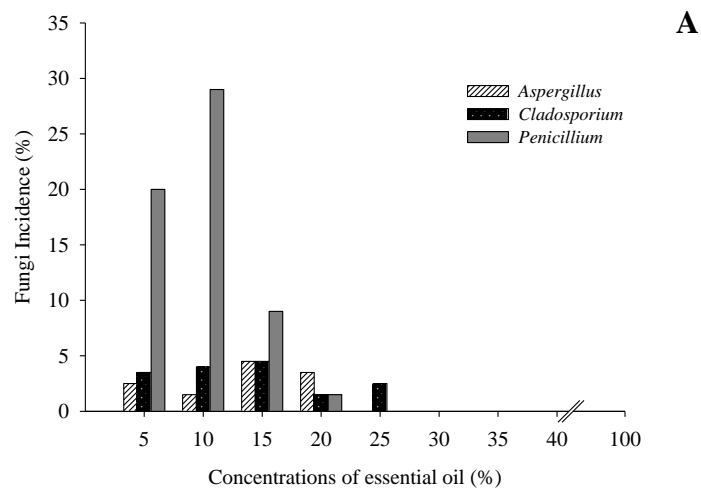
* (+) pathogenic fungus; (-) not pathogenic fungus

Mycoflora control in basil seeds by basil and citronella grass essential oils and copaiba vegetable oil

The essential oils significantly reduced the fungi incidence when it was compared to the untreated control. It was observed that with increasing of essential oils concentration was a reduction in the fungi incidence on basil seeds. However, there was difference in seed germination among the essential oils, ranging from 0 - 79.9% when treated with different concentrations of basil essential oils, 0 - 84.5% citronella grass and 49 - 79.5% copaiba. Complete absence of germination

was observed when the seeds were treated with concentrations of 40 and 100% of the basil and citronella grass essential oils. The copaiba oil showed less effect on the seeds germination, even when treated with pure oil (around 50% germination rate).

Among the fungi detected in the basil seeds after essential oils treatment, there was incidence of the following genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Papularia*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Phoma*, and *Rhizopus*, which mostly are considered contaminants in storage conditions. The genera with the highest incidence were *Aspergillus*, *Cladosporium*, and *Penicillium* (Figure 1).



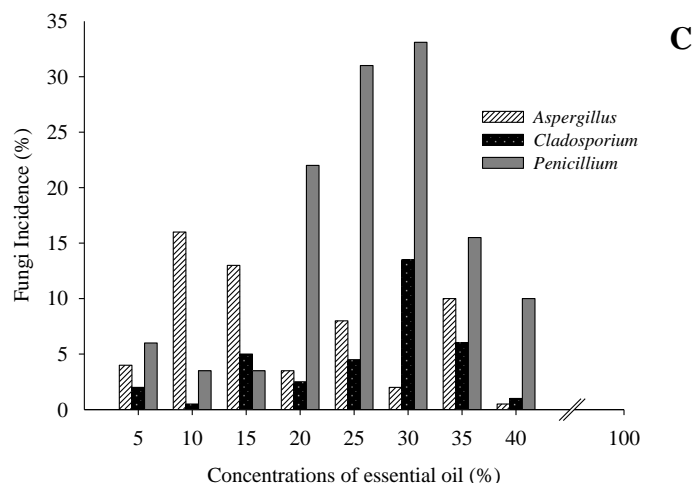


Figure 1. Fungi incidence on basil seeds treated with (A) basil, (B) citronella grass, and (C) copaiba essential oils at different concentrations.

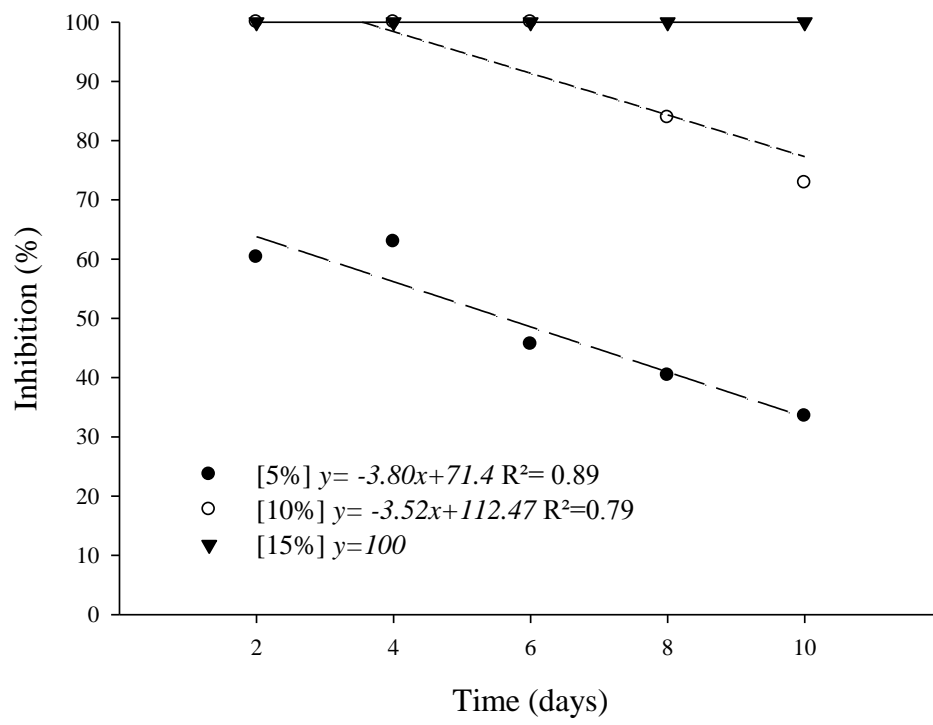
Colletotrichum, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Papularia*, *Pestalotia*, and *Phoma* were completely inhibited at all basil essential oils concentrations tested. In the treatments with citronella grass essential oil and copaiba vegetable oil, there was no development of the genera *Chaetomium* and *Rhizopus*, respectively. The 30% basil essential oil concentration inhibited 100% of the seeds mycoflora. Using citronella grass essential oil complete mycoflora inhibition was observed from the 40% concentration. With the use of copaiba oil we noted the incidence of fungi in almost all concentrations tested, except when the pure essential oil was used.

Effect of essential oils on *Curvularia* sp. *in vitro*

Citronella grass and basil essential oils inhibited the mycelial growth of *Curvularia* sp. in a dose-dependent manner (Figure 2). Citronella grass essential oil exhibited 100% inhibition on mycelial growth from a concentration of 15%. On the other hand, basil essential oil presented complete inhibition on mycelial growth from the 25% concentration. After six days was observed at 5 to 10% concentrations of basil essential oil that there was no inhibition in mycelial growth compared to the control treatment.

The essential oils concentrations showed significant differences in mycelial growth rate index (MGRI). When subjected to treatment with citronella grass essential oil, the MGRI were 9.74 and 1.93 mm·day⁻¹ for 5 and 10% concentrations, respectively.

For basil essential oil, the MGRI were 20.64, 15.63, 9.39, and 1.67 mm·day⁻¹ for 5, 10, 15, and 20% concentrations, respectively.



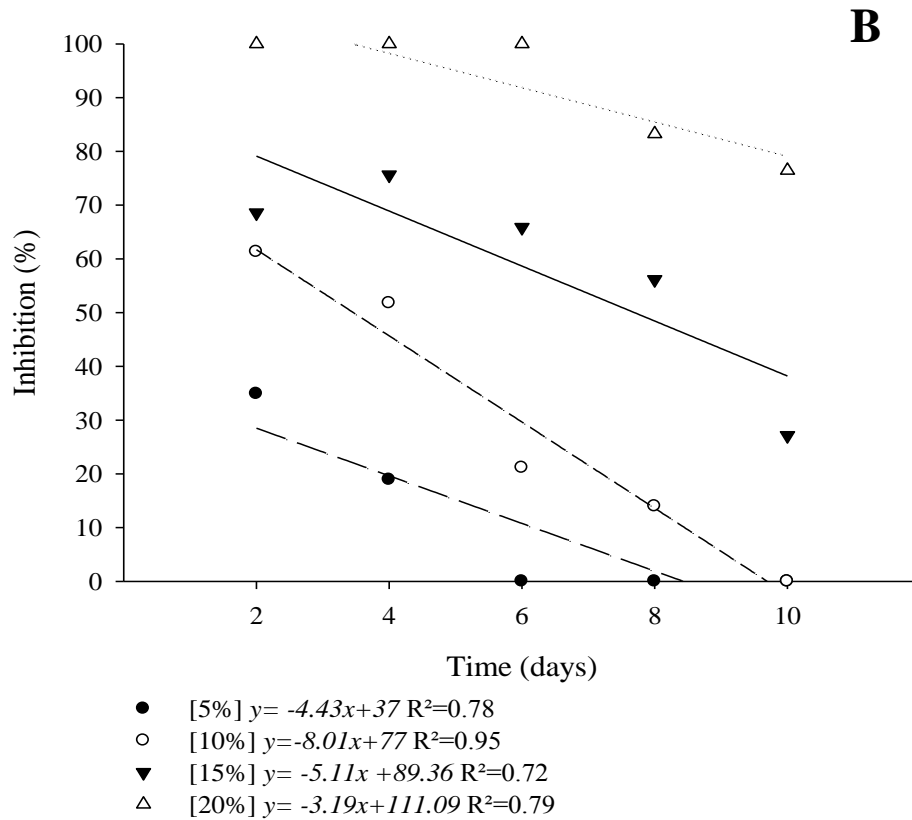


Figure 2. Inhibitory effect of different concentrations of citronella grass (A) and basil (B) essential oils on the mycelial growth of *Curvularia* sp.

Effects of citronella grass essential oil concentration on conidia germination

It was found that with increasing concentration of the citronella grass essential oil there was a reduction in the number of germinated conidia of *Curvularia* sp. (Figure 3). Complete inhibition of conidia germination was observed from the 3.5% concentration. The lowest essential oil concentration (0.1%) inhibited conidia germination in approximately 35%.

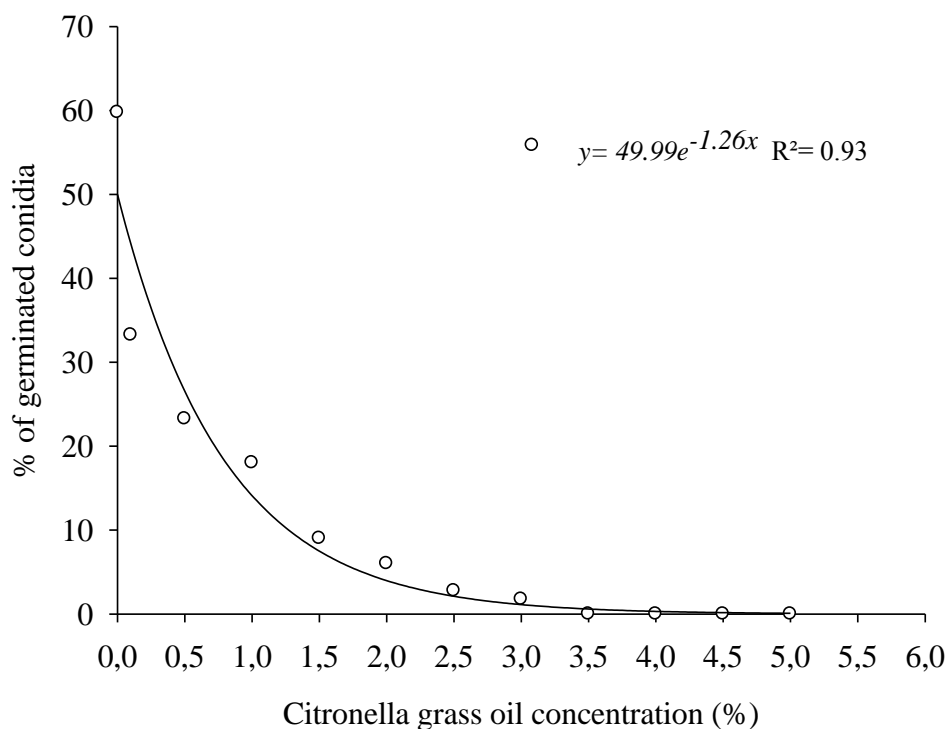


Figure 3. Effect of citronella grass essential oil at different concentration on the percentage of *Curvularia* sp. germinated conidia.

Phytotoxicity of citronella grass essential oil on basil plants

We observed that the use of citronella grass essential oil in basil plants caused phytotoxicity from the concentration of 1.0% (Table 2). It was possible notice the emergence of chlorosis and the beginning of small necrosis formation in the foliar limb primarily at the leaves edges and veins, locations where, consequently, accumulation of essential oil solution could have occurred. Due to phytotoxicity observed with the use of 1% essential oil concentration, it was decide use the lowest essential oil concentration in subsequent in vivo tests.

Table 2. Phytotoxicity of different concentrations of citronella grass essential oil in basil plants

Treatments	Phytotoxicity Symptoms
H ₂ O	no phytotoxicity observed
H ₂ O + Tween	no phytotoxicity observed
0.5%	no phytotoxicity observed

1.0%	1 – 25% = mild chlorosis or necrosis starting on leaves
1.5%	26 – 50% = chlorosis or necrosis average on leaves
2.0%	26 – 50% = chlorosis or necrosis average on leaves
2.5%	26 – 50% = chlorosis or necrosis average on leaves

Preventive and curative control of *Curvularia* spot

It was found a significant difference on the preventive control of *Curvularia* spot with the use of citronella grass essential oil, while for the curative control, was not observe any variation among the treatments (Table 3). The control with fungicide and the treatments with 0.50 and 0.75% concentration of citronella grass essential oil had the lowest area under the disease progress curve (AUDPC) when applied preventively.

Table 3. Area under the disease progress curve (AUDPC) of *Curvularia* spot in the preventive and curative control with use of citronella grass essential oil. Gurupi-TO, 2015

Treatments	AUDPC *	
	Preventive	Curative
H ₂ O + Tween	38.25 ab	140.75 a
Thiophanate Methyl	7.00 b	67.13 a
0.0	88.25 a	200.25 a
0.25	33.25 ab	161.25 a
0.50	14.37 b	149.50 a
0.75	8.75 b	94.88 a
CV (%)	33.83	25.29

*Means followed by the same letter in the columns do not differ by Tukey test at 5% probability.

**Original data were transformed to $\sqrt{x+1}$

DISCUSSION

There is a little information available on essential oils effect in the control of pathogens present in medicinal plant seeds. The present study demonstrated that the utilization of citronella grass essential oil presented an inhibitory effect on the mycoflora development in basil seeds. We

also showed a potential fungitoxic effect of this essential oil on the mycelial growth of *Curvularia* sp.

The genera found in basil seeds are considered important species that cause leaf spot (*Alternaria*, *Curvularia*), rotting roots and plant stem base and plants from wilting (*Fusarium*) in several species (Kruppa and Russomanno, 2006). The species *Nigrospora* sp., *Papularia* sp., and *Chaetomium* sp. are described as contaminating organisms associated with mycoflora of different plant species' seeds (Botelho *et al.*, 2008; Vanzolini *et al.*, 2010), and the presence of the *Aspergillus* and *Penicillium* generally indicates poor quality or problems in the seeds conservation (Kruppa and Russomanno, 2006). The use of essential oils in basil seeds for mycoflora control presented a promising effect. However, at high concentrations the use of essential oils can reduce the seed germination rate.

Several previous *in vitro* studies have demonstrated fungicidal activity of citronella grass essential oil in *Cercospora coffeicola* (Pereira *et al.*, 2011), *Rhizoctonia solani* (Sarmiento-Brum *et al.*, 2013), *Didymella bryoniae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Amphobotrys ricini* (Velooso *et al.*, 2012). In the present work, it was clear that the citronella grass essential oil can significantly inhibits the mycelial growth of *Curvularia* sp. The basil essential oils, however, showed no significant inhibition of mycelial growth as compared to the citronella grass essential oil. With increased essential oil concentrations, there was a reduction in the mycelial growth, presenting no growth from 15% and 25% of citronella grass and basil essential oil, respectively.

The *Curvularia* sp. conidia germination inhibition was proportional to the increase of the concentration of citronella grass essential oil. After the 3.5% concentration there was no *Curvularia* sp. conidia germination. Other studies have reported the effect of citronella grass essential oil and plant extract inhibiting conidia germination of *C. coffeicola* (Pereira *et al.*, 2011) and *Curvularia eragrostidis* (Brito and Nascimento, 2015).

One limitation to work with essential oils in disease control is the possible toxic effects on the plant. Thus, the evaluation of essential oil phytotoxicity is of crucial importance for driving *in vivo* testing. No phytotoxicity symptom was observed in this study due to the application of the citronella grass essential oils at 0.75% concentration.

In the *in vivo* assay, significant results were observed in the AUIPC of *Curvularia* spot with increasing concentrations of citronella grass essential oil. The *in vivo* results demonstrated the potential of citronella grass essential oil to control in a preventive manner the *Curvularia* spot incidence and severity in basil plants. Preventive application in a dose of 0.75% showed greater efficacy in disease control and had of similar effectiveness in the fungicide application. However, in

the curative control, none essential oil concentration applied or fungicide is effective to promote the disease control. This demonstrated the importance of control measures to prevent plant disease.

Observed a reduction in the soybean (Medici *et al.*, 2007) rust severity and *Cercospora* leaf spot in coffee (Pereira *et al.*, 2011), using the citronella grass essential oil in a preventive manner. These authors attribute the results to the presence of compounds such as geraniol and citronellal in the chemical composition of citronella grass essential oil. Secondary compounds present in medicinal plants, as already registered for citronella grass, can play important functions in plant-pathogen interactions through direct microbial action or by inducing a defense mechanism (Bonaldo *et al.*, 2004). However, the defense mechanisms activation in plant by use of essential oils has not been clearly elucidated. The results obtained in the present study do not allow us to exclude the possibility that exposure to low concentrations of the citronella grass essential oil may stimulate the basil plants to synthesize defense substances against the pathogen *Curvularia* sp.

Prevent the establishment pathogens in crops is the best alternative for sustainable management with the use of naturally derived substances. In a special case of medicinal plants, that the production of active principles is affected by chemical pesticides, the use of essential oils as treatment may prove to be a viable alternative for the phytopathogens control. The data obtained in this study provide evidence that the application of the citronella grass essential oil in a preventive manner can act reducing the leaf diseases incidence and severity in medicinal species.

ACKNOWLEDGMENTS

The first author gratefully acknowledge the Federal University of Tocantins and CAPES by the fellowship.

REFERENCES

Barnett H.C., Hunter B.B., 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3th Ed. Burgess Publishing, Mineapolis, USA.

- Blank A.F., Souza E.M., Paula J.W.A., Alves P.B., 2010. Comportamento fenotípico e genotípico de populações de manjeriço. *Horticultura Brasileira* **28**: 305-310.
- Bonaldo S.M., Schwan-Estrada K.R.F., Stangarlin J.R., Tessmann D.J., Scapim C.A., 2004. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira* **29**: 128-134.
- Botelho L.S., Moraes H.D., Menten J.O., 2008. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. *Summa Phytopathologica* **34**: 343-348.
- BRASIL (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Brasília: Mapa/ACS, 399 p.
- Brito N.M., Nascimento L.C., 2015. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **17**: 230-238.
- Camatti-Sartori V., Magrini F.E., Crippa L.B., Marchetti C., Venturin L., Silva-Ribeiro R.T., 2011. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. *Revista Brasileira de Agroecologia* **6**: 117-122.
- Cogliatti M., Juan V.F., Bongiorno F., Dalla Valle H., Rogers W.J., 2011. Control of grassy weeds in annual canary grass. *Crop Protection* **30**: 125-129.
- Dequech S.T.B., Ribeiro L.P., Sausen C.D., Egewarth R., Kruse N.D., 2008. Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica. *Revista da FZVA* **15**: 71-80.
- Edington L.V., Khew K.L., Barron G.L., 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology* **61**: 42-44.
- Ellis M.B., 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, England.
- Fernandes P.C., Facanali R., Teixeira J.P.F., Furlani P.R., Marques M.O.M., 2004. Cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. *Horticultura Brasileira* **22**: 260-264.
- Ferreira D.F., 2010. SISVAR - *Sistema de análise de variância*. Versão 5.4. UFLA, Lavras-MG.
- Flávio N.S.D.S., Sales N.L.P., Aquino C.F., Soares E.P.S., Aquino L.F.S., Catão H.C.R.M., 2014. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais. *Semina: Ciências Agrárias* **35**: 7-20.
- Freitas S.P., Moreira J.G., Freitas I.L.J., Freitas Júnior S.P., Amaral Júnior A.T., Silva V.Q.R., 2009. Fitotoxicidade de herbicidas a diferentes cultivares de milho-pipoca. *Planta Daninha* **27**:1095-1103.
- Garcia R.A., Juliatti F.C., Barbosa K.A.G., Cassemiro T.A., 2012. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal* **28**:48-57.
- Kruppa P.C., Russomanno O.M.R., 2006. Fungos associados a sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família Apiaceae. *Biológico* **68**: 610-612.

- Kruppa PC, Russomanno OMR (2008) Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família Lamiaceae. *Tropical Plant Pathology* **33**: 072-075.
- Kruppa P.C., Russomanno O.M.R., 2011. Fungos em plantas medicinais, aromáticas e condimentares – solo e sementes. *Biológico* **73**: 33-38.
- Maia F.G.M., Armesto C., Zancan W.L.A., Maia J.B., Abreu M.S., 2011. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. *Bioscience Journal* **27**: 205-210.
- Medice R., Alves E., Assis R.T., Magno Junior R.G., Lopes E.A.G.L., 2007. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e Agrotecnologia* **31**: 83-90.
- Ootani M.A., Aguiar R.W.S., Ramos A.C.C., Brito D.R., Silva J.B., Cajazeira J.P., 2013. Use of essential oils in agriculture. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* **4**: 162-174.
- Pereira M.C., Vilela G.R., Costa L.M.A.S., Silva R.F., Fernandes A.F., Fonseca E.W.N., Piccoli R.H., 2006. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciência e Agrotecnologia* **30**: 731-738.
- Pereira R.B., Lucas G.C., Perina F.J., Resende M.L.V., Alves E., 2011. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. *Ciência Agrotecnológica* **35**: 115-123.
- Reis A., Miranda B.E.C., Boiteux L.S., Henz G.P., 2007. Murcha do manjeriço (*Ocimum basilicum*) no Brasil: agente causal, círculo de plantas hospedeiras e transmissão via semente. *Summa Phytopathologica* **33**: 137-141.
- Ribeiro D.S., Melo D.B., Guimarães A.G., Velozo E.S., 2012. Evaluation of the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) as modulator of bacterial resistance. *Semina: Ciências Agrárias* **33**: 687-696.
- Russomanno O.M.R., Kruppa P.C., 2010. Doenças fúngicas das plantas medicinais, aromáticas e condimentares – parte aérea. *Biológico* **72**: 31-37.
- Russomanno O.M.R., Kruppa P.C., Minhoni M.T.A., 2010. Efeitos de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento da murcha de *Fusarium oxysporum* em alecrim e manjeriço. *Biológico* **72**: 39-45.
- Santos G.R., Café-Filho A.C., Leão F.F., César M., Fernandes L.E., 2005. Progresso do crestamento gomoso e perdas na cultura da melancia. *Horticultura Brasileira* **23**: 228-232.
- Sarmiento-Brum R.B.C., Santos G.R., Castro H.G., Gonçalves C.G., Cardon C.H., Leão E.U., Sarmiento R.A., 2013. Avaliação *in vitro* de diferentes métodos de análises de fungitoxicidade de óleos essenciais. *Bioscience Journal* **29**: 623-626.
- Vanzolini S., Meorin E.B.K., Silva R.A., Nakagawa J., 2010. Qualidade sanitária e germinação de sementes de pinhão-manso. *Revista Brasileira de Sementes* **32**: 009 - 014.
- Veloso R.A., Castro H.G., Cardoso D.P., Santos G.R., Barbosa L.C.A., Silva K.P., 2012. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **47**: 1707-1713.

CAPITULO II

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FRUTOS DE *Morinda citrifolia* L.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FRUTOS DE *Morinda citrifolia* L.

RESUMO

A espécie *Morinda citrifolia* L. popularmente conhecida por Noni tem despertado o interesse de diversas instituições de pesquisa devido as suas propriedades farmacológicas. Os compostos sintetizados por esta espécie podem ser explorados como medida alternativa no controle de fitopatógenos causadores de lesões foliares na cultura do milho. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial do óleo essencial de frutos maduros de *M. citrifolia* no controle *in vitro* e *in vivo* de *Bipolaris maydis* e *Exserohilum turcicum* isolados a partir de plantas de milho. Frutos maduros foram submetidos à extração do óleo essencial pelo método de hidrodestilação utilizando Clevenger. Efetuou-se análise da composição química do óleo essencial por EM/CG, identificando como constituinte majoritário o ácido octanóico (82,24%). Avaliou-se o crescimento micelial *in vitro* e também o controle *in vivo* das doenças mancha de bipolaris e mancha de exserohilum em plantas de milho. Concluiu-se que o fruto de *M. citrifolia* possui potencial de produção de óleo essencial e este apresenta propriedades fungitóxicas, inibindo o crescimento micelial de *B. maydis* e *E. turcicum*, e atividade fungicida, com valores de AACPD de mancha de bipolaris e mancha de exserohilum, à concentração de 0,25% de óleo essencial, inferiores aos valores observados para os tratamentos com aplicação de fungicida. O controle preventivo de manchas foliares em plantas de milho, utilizando óleo essencial de *M. citrifolia* pode minimizar a severidade de doenças.

Palavras chave: *Bipolaris maydis*, *Exserohilum turcicum*, *Morinda citrifolia* L., Fungitoxicidade

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOATIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *Morinda citrifolia* L. FRUIT

ABSTRACT

Morinda citrifolia L. species popularly known for Noni has aroused the interest of several research institutions due to its pharmacological properties. The compounds synthesized by this species can be explored as alternative measure in the control of plant pathogens causing leaf lesions in maize. The aim of this study was to evaluate the essential oil potential extracted from ripe fruits of *M. citrifolia* in control *in vitro* and *in vivo* of *B. maydis* and *E. turcicum* isolated from maize plants. Ripe fruits were subjected to extraction of essential oil by hydrodistillation method using Clevenger. Effectuated chemical composition analysis of the essential oil by MS/GC. Evaluated the mycelial growth *in vitro* and *in vivo* control of *Bipolaris* spot and *Exserohilum* spot diseases in maize plants. Concluded that the fruit of *M. citrifolia* has essential oils production potential, and this has fungicidal activity with AUDPC values bipolaris spot and exserohilum spot, the concentration of 0.25% essential oil, smaller than the values observed for the treatments with fungicide application. The preventive control of leaf spot in maydis plants using essential oil of *M. citrifolia* can minimize the severity of diseases.

Keywords: *Bipolaris maydis*, *Exserohilum turcicum*, *Morinda citrifolia* L., Fungitoxicity.

INTRODUÇÃO

Morinda citrifolia L. é uma planta exótica e medicinal pertencente à família Rubiaceae popularmente conhecida por Noni. Esta espécie é nativa do Sudoeste da Ásia e Austrália, com um longo histórico de utilização como medicamento e como alimento nas ilhas do Oceano Pacífico, sendo considerada a segunda planta medicinal mais importante nas Ilhas Havaianas (WANG et al., 2002; PAWLUS e KINGHORN, 2007).

A importância de *M. citrifolia* se deve às propriedades terapêuticas que lhe são atribuídas, com ampla utilização na medicina popular e na fabricação de fitofármacos (LIMA e LIMA, 2013), sendo indicada no tratamento de artrites, asma, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, inflamações, dores e como tônico para a promoção da saúde em geral (McCLATCHEY, 2002; GARCÍA-VILAS et al., 2015). Devido às recomendações de sua utilização como suplemento dietético, tem aumentado a procura de seus derivados, principalmente na forma de sucos, nos Estados Unidos, Europa e em outras regiões do mundo (PAWLUS et al., 2005).

A espécie *M. citrifolia* sintetiza diversos compostos químicos biologicamente ativos. A lista de componentes químicos identificados aumenta consideravelmente a medida que as pesquisas são direcionadas à caracterização de novas moléculas (PAWLUS e KINGHORN, 2007; CORREIA et al., 2011). Um dos produtos de significativa importância de seu metabolismo é a síntese de óleo essencial. Os óleos essenciais são misturas complexas formadas por compostos orgânicos, e tem despertado o interesse das intuições de pesquisas quanto a aplicação no controle alternativo de doenças em plantas, minimizando a utilização excessiva de pesticidas. Estudos tem apontado resultados promissores, demonstrando que as espécies medicinais conferem em importantes fontes de moléculas com potencial fungicida (GUIMARAES et al., 2011; HILLEN et al., 2012).

Entre as doenças, as quais os óleos essenciais podem causar efeito fungitóxico, estão as doenças foliares da cultura do milho (*Zea mays* L.). O milho é uma commodity de grande importância socioeconômica em todas as regiões brasileiras, apresentando significativo aumento de produção no estado do Tocantins com produtividade média de 3,6 toneladas por hectare (CONAB 2016). No entanto, um dos fatores limitantes ao desenvolvimento da cultura no Estado tem sido a presença de fitopatógenos causadores de lesões foliares (CHAGAS et al., 2015), exigindo assim, intensa utilização de produtos químicos no controle de doenças, que além dos danos causados ao meio ambiente tem promovido a resistência dos fitopatógenos.

A maioria dos relatos quanto à composição química (WEI et al., 2011) e atividade biológica dos derivados de *M. Citrifolia*, remetem-se ao suco e extratos dos frutos (CANDIDA et al., 2015). De acordo com a literatura consultada não existem estudos demonstrando o potencial de utilização do óleo essencial dessa espécie no controle de fitopatógenos. Desta forma, o objetivo do presente

estudo foi avaliar o potencial do óleo essencial de frutos maduros de *M. citrifolia* no controle *in vitro* e *in vivo* de *Bipolaris maydis* e *Exserohilum turcicum* isolados a partir de plantas de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de óleo essencial

Frutos maduros de *M. citrifolia* foram lavados em água corrente, cortados em pequenos cubos e submetidos a extração de óleo essencial pelo método de hidrodestilação. Em um balão de fundo redondo com capacidade de dois litros foram colocados 200 g de frutos maduros, acrescentando-se um litro de água destilada e levados à fervura por duas horas em aparelho Clevenger. Após a extração, o óleo essencial foi coletado na forma de sobrenadante, depositados em frasco âmbar, identificado e armazenado à $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até a sua utilização.

Análises cromatográficas do óleo essencial

As análises qualitativas do óleo essencial foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa CG-EM. O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu GC-2010 equipado com detector seletivo de massa modelo QP2010 Plus, sendo o equipamento operado nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura de filme); com a programação da temperatura na coluna de 60 – 240°C ($3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$); temperatura do injetor de 220°C; gás carreador hélio; injeção com taxa de split (1:100) com volume injetado de 1 μL de uma solução 1:1000 em hexano. Para o espectrômetro de massas (EM), foram utilizadas as seguintes condições: energia de impacto de 70 eV; temperatura da fonte de íons e da interface de 200°C. Foi injetada, nas mesmas condições das amostras, uma série homóloga de n-alcanos ($\text{C}_9\text{H}_{20} \cdots \text{C}_{26}\text{H}_{54}$).

Os constituintes foram identificados comparando seus espectros de massas com aqueles dos bancos de dados das bibliotecas Nist e Wiley 229, e confirmada suas identidades por meio da comparação entre os seus índices de retenção calculados com aqueles presentes no webbook Nist e com a literatura (ADAMS, 2007).

A quantificação dos teores dos compostos, expressa em porcentagem tendo como base a normatização de áreas, foi obtida por meio de um cromatógrafo gasoso equipado com um detector de ionização de chamas (DIC), utilizando-se um aparelho Shimadzu GC-2010, nas seguintes condições experimentais: coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura de filme); temperatura do injetor: 220°C; temperatura do DIC: 300°C; programação da coluna: temperatura inicial de 60°C com uma taxa de aquecimento de $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 240°C, em seguida, passando para uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 300°C, permanecendo nessa temperatura por 10 min.; gás de arraste nitrogênio ($1,18 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$); taxa de split 1:50; pressão na coluna de 115 KPa e volume injetado de 1 μL , diluído em hexano (1:100 v/v).

Bioatividade

Isolamento dos fitopatógenos

A partir de folhas de plantas de milho contendo lesões foram isolados inóculos dos fitopatógenos *Bipolaris maydis* e *Exserohilum turcicum*. Pequenos fragmentos foram removidos das folhas lesionadas, submetidos à assepsia com álcool (50%) por 40 segundos e solução de hipoclorito de sódio (1%) por 30 segundos, e em seguida, lavados três vezes em água destilada. Após o processo de assepsia os fragmentos foliares foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar), e posteriormente, as placas foram lacradas, identificadas e mantidas em câmara de incubação à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas durante sete dias para o desenvolvimento do patógeno. Após o período de incubação foi realizada a confirmação do patógeno, com a identificação destes, baseado em suas características morfológicas, com auxílio de microscópio estereoscópico óptico e literatura especializada (ELLIS, 1971; BARNETT e HUNTER, 1972).

Em seguida, para obtenção de colônias puras e multiplicação dos fitopatógeno *B. maydis* e *E. turcicum*, foram efetuadas repicagens para novas placas de Petri, contendo meio de cultura BDA. Com uma pinça, os materiais provenientes dos isolamentos, foram depositados em placas de Petri, as quais foram lacradas, identificadas e armazenadas em câmara de incubação à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas.

Bioensaios *in vitro*

Para avaliar o potencial do óleo essencial de *M. citrifolia* na inibição do crescimento micelial foram testadas oito concentrações de óleo essencial (0,5; 2,0; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5 e 11%) e mais uma testemunha (apenas meio BDA sem a aplicação de óleo essencial – 0,0%), avaliadas em cinco épocas de avaliações (2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação), adotando-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições.

Como solução dispersante para diluição das concentrações de óleo essencial, utilizou-se uma solução estoque de Tween 80 à concentração de 1%. Preparou-se uma solução estoque de óleo essencial à 11%, a partir da qual foram efetuadas diluições para obtenção das demais concentrações avaliadas.

Em placas de Petri de 70 x 15 mm, contendo meio de cultura BDA foi depositado 100 μL das concentrações de óleo essencial, e em seguida, espalhados na superfície do meio de cultura com alça de Drigalsky. Posteriormente, no centro de cada placa foi depositado um disco de 4 mm de diâmetro de meio de cultura BDA contendo o material fúngico. As placas foram vedadas, identificadas e incubadas por dez dias, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Foram efetuadas cinco avaliações com intervalos regulares de 48 horas até completarem os dez dias de incubação. As avaliações consistiram de mensurações do diâmetro micelial (média de duas medidas diametralmente opostas), utilizando-se um paquímetro digital.

Bioensaios *in vivo*

Fitotoxicidade

Para o teste de fitotoxicidade do óleo essencial de *M. citrifolia*, utilizou-se cinco diferentes concentrações de óleo essencial (0,25, 0,50, 0,75, 1,0 e 1,5% v.v.) e duas testemunhas, uma com aplicação de apenas água destilada e a outra com aplicação de solução de água destilada e Tween 80 (1%).

Plantas de milho cultivadas em vaso com 30 dias após semeadura, foram pulverizadas com 20 mL de solução de óleo essencial, nas diferentes concentrações, utilizando-se borrifador manual. As plantas foram mantidas à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e após 24 horas efetuou-se a avaliação de fitotoxicidade nas plantas, adotando-se a escala de notas adaptada de Dequech et al. (2008), Freitas et al. (2009) e Cogliatti et al. (2011), onde: 0% = ausência de fitotoxicidade; 1 – 25% = leve necrose nas folhas ou leve clorose da planta; 26 – 50% = necrose moderada nas folhas ou clorose moderada da planta; 51 – 75% = alta necrose nas folhas ou alta clorose da planta; 76 – 100% = murcha e ressecamento da planta.

Controle preventivo

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os tratamentos consistiram de quatro concentrações de óleo essencial de *M. citrifolia* (0,002, 0,01, 0,05, 0,25% v.v.) e duas testemunhas: uma com a pulverização de apenas água destilada (0.0%) e a outra com a pulverização de solução de fungicida sistêmico Piori Xtra[®] à 0,1%.

No controle preventivo da mancha de *Bipolaris* e mancha de *Exserohilum*, as plantas de milho foram pulverizadas com 20 mL das diferentes concentrações de óleo essencial utilizando-se um borrifador manual. Após 24 horas da inoculação do óleo essencial, aplicou-se 20 mL da solução de conídios (10^4 conídios·mL⁻¹). Em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida e escura, e após 24 horas foram levadas ao ambiente natural, à sombra e temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, para o desenvolvimento da doença. Após o surgimento das lesões características da doença, foram efetuadas cinco avaliações de severidade da doença, com intervalos regulares de 48 horas, adotando-se a escala de notas estipulada por Santos et al. (2005).

Estimou-se o progresso das doenças mancha de *Bipolaris* e mancha de *Exserohilum* em plantas de milho, a partir dos valores de notas obtidos nas cinco avaliações de severidade das

doenças, calculando-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), segundo Shaner e Finney (1977)

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e de regressão com base nos coeficientes a 5 ou 1% de probabilidade, utilizando o programa estatístico ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à composição química do óleo essencial de *M. citrifolia*, observou-se que o constituinte majoritário foi o ácido octanóico com 82,24% (tabela 1). No óleo essencial houve a presença de maior número de compostos com função éster, no entanto os ácidos octanóico e hexanóico foram os principais constituintes. Segundo Pino et al. (2010) a presença de ésteres em frutos de *M. citrifolia* é que conferem o aroma frutado característico dos frutos maduros.

Tabela 1. Porcentagem relativa (%), obtida por Cromatografia à Gás acoplada a Detector de Espectrometria de Massas, dos constituintes do óleo essencial de frutos maduros de *Morinda citrifolia* L. Gurupi-TO, 2016

NC	Constituintes	IR	(%)
1	3-metil-3-butenil-1-acetato	888	-
2	2-heptanona	897	-
3	Hexanoato de metila	922	-
4	Ácido hexanóico	987	8,26
5	Hetanoato de etila	999	2,48
6	Octanoato de metila	1123	-
7	Ácido octanóico	1177	82,24
8	Octanoato de etila	1196	-
9	Hexanoato de isopentila	1259	1,6
10	3-metil-2-butenil hexanoato	1292	-
11	Não identificado	-	-
12	3-metilbutil octanoato	1457	4,25
13	3-metilbut-2-enil octanoato	1489	-
Teor de óleo essencial (%)			0,02

NC = Número de compostos; IR = Índice de retenção calculado

* Não quantificado (valores < 0,05)

O ácido octanóico também conhecido por ácido caprílico é um ácido graxo saturado, líquido oleoso, minimamente solúvel em água, que apresenta odor ligeiramente rançoso e sabor desagradável. Encontrado naturalmente no leite de alguns mamíferos, no óleo de coco de babaçu e sementes de palma, é aplicado comercialmente na produção de ésteres utilizado em perfumaria e também na fabricação de corantes (BEARE-ROGERS et al., 2001).

O teor de óleo essencial de frutos de *M. citrifolia* foi de aproximadamente 0,2%, estando dentro do intervalo divulgado na literatura, que variam de 0,016% a 0,3% (CANUTO et al., 2010; CORREIA et al., 2011; PALIOTO et al., 2015).

Bioatividade

Teste *in vitro*

O óleo essencial de *M. citrifolia* apresentou potencial de inibição no crescimento micelial dos fitopatógenos avaliados (Figura 2). Observou-se que o aumento da concentração de óleo essencial promoveu a redução no crescimento micelial, levando a 100% de inibição no crescimento micelial de *B. maydis* e *E. turcicum* a partir das concentrações de 8,0% e 5,0%, respectivamente.

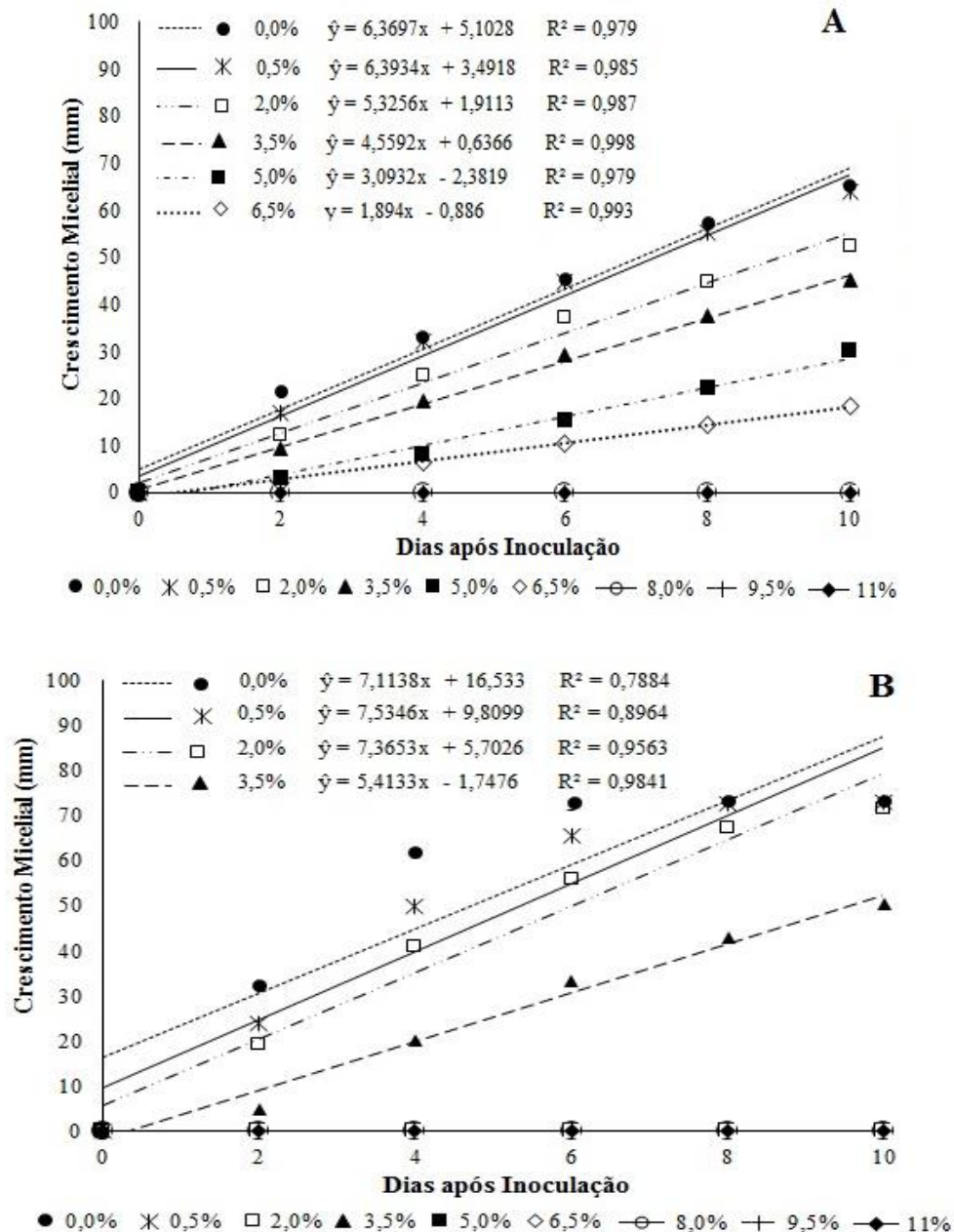


Figura 2. Crescimento micelial médio de *Bipolaris maydis* (A) e *Exserohilum turcicum* (B), submetidos a nove concentrações de óleo essencial de *Morinda citrifolia* L. (0,0; 0,5; 2,0; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5 e 11,0%), em cinco épocas de avaliação.

A partir das equações de regressão é possível observar que apesar de *B. maydis* ter apresentado total inibição de crescimento micelial a partir da concentração de 8,0% de óleo essencial, o desenvolvimento do fungo foi menor, com variação de aproximadamente 6,4 mm·dia⁻¹ no tratamento testemunha, e 1,9 mm·dia⁻¹ à concentração de 6,5% de óleo essencial. Enquanto, que para o crescimento micelial médio do fitopatógeno *E. turcicum* variou de aproximadamente 7,1 mm·dia⁻¹ no tratamento testemunha, e 5,4 mm·dia⁻¹ à concentração de 3,5% de óleo essencial.

Devido à complexidade na composição química dos óleos essenciais, assume-se que existem vários mecanismos de ação, que não estão ainda bem definidos, que podem resultar na inibição de agentes patogênicos. Tais mecanismos podem ser, por exemplo, a desnaturação de proteínas, inibição de enzimas e/ou desintegração da membrana celular dos fungos, levando ao extravasamento do líquido celular (BAKKALI et al., 2008; ROZWALKA et al., 2010).

O índice de velocidade do crescimento micelial, demonstrou que o óleo essencial de *M. citrifolia* interferiu no desenvolvimento dos fitopatógenos avaliados conforme aumentou-se as concentrações (Figura 3).

Houve elevado ajuste ao modelo linear, representado pelos coeficientes de determinação para as duas equações geradas. Os índices de velocidade de crescimento micelial foram de 99 e 91% para os fitopatógenos *B. maydis* e *E. turcicum*, respectivamente. Segundo a equação ajustada, a cada acréscimo de 1% na concentração de óleo essencial, estima-se um decréscimo na velocidade de crescimento micelial de aproximadamente, 2,22 e 3,55 mm·dia⁻¹ para os fungos *B. maydis* e *E. turcicum*, respectivamente.

Apesar de apresentar o índice de velocidade de crescimento micelial menor para o fitopatógeno *B. maydis*, o óleo essencial de *M. citrifolia* foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial de *E. turcicum*, pois este fitopatógeno foi totalmente inibido a uma concentração de óleo essencial inferior à observada para a total inibição do crescimento micelial de *B. maydis*.

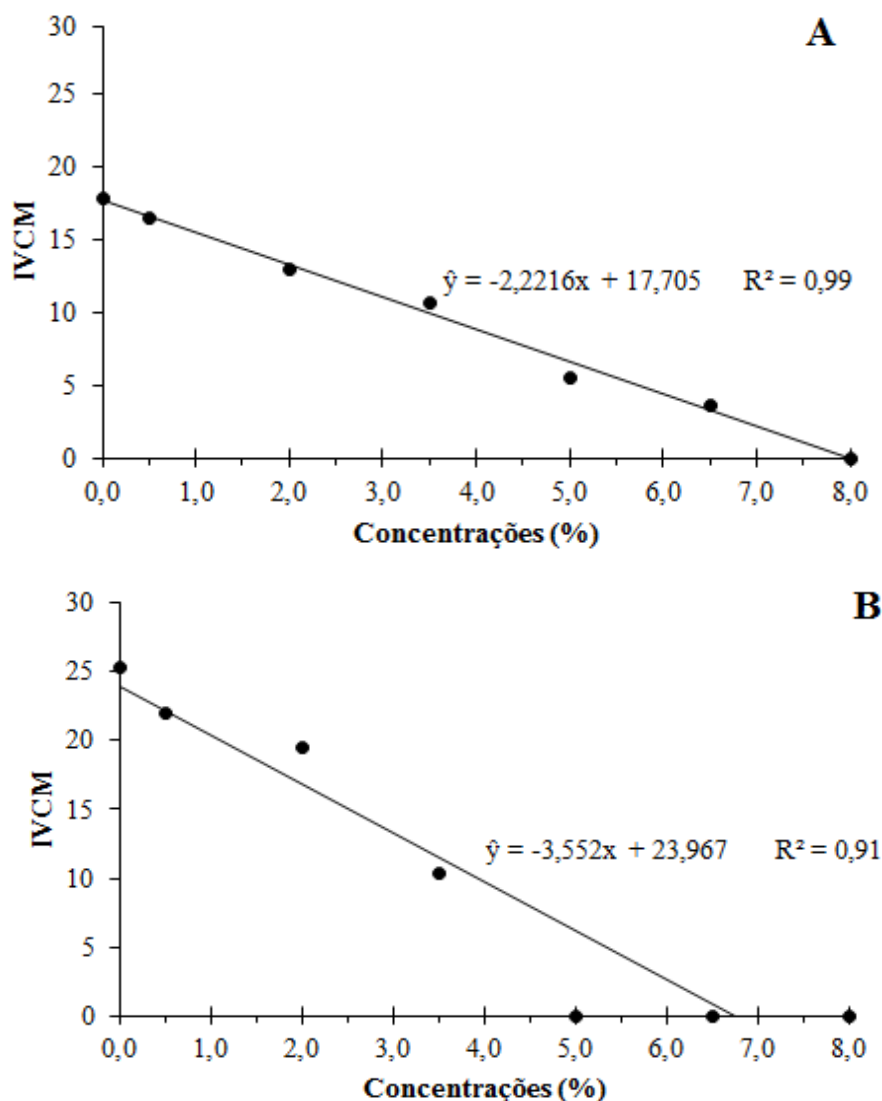


Figura 3. Índice de velocidade de Crescimento micelial (IVCM) de *Bipolaris maydis* (A) e *E. turcicum* (B), submetidos a nove concentrações de óleo essencial de *Morinda citrifolia* L. (0,0; 0,5; 2,0; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5 e 11,0%), em cinco épocas de avaliação

Teste *in vivo*

Fitotoxicidade

Observou-se fitotoxicidade a partir da concentração de 0,5% de óleo essencial de *M. citrifolia* em plantas de milho, apresentando sintomas de necrose e clorose em níveis variando de 51 a 75% do limbo foliar (Tabela 2).

O elevado grau de fitotoxidez causado pelo óleo essencial nas concentrações testadas, permitiu estipular que a concentração de 0,25% de óleo essencial de *M. citrifolia* seria a máxima concentração adotada no controle preventivo de doenças foliares em plantas de milho.

Tabela 2. Fitotoxicidade de diferentes concentrações (0,25, 0,50, 0,75, 1,0 e 1,5%) do óleo essencial de *Morinda citrifolia* L. e duas testemunhas (1 - apenas água destilada; 2 - solução de água destilada mais Tween 80) em plantas de milho. Gurupi-TO, 2016

Tratamentos	Sintomas de fitotoxicidade
H ₂ O	0% = Ausência de fitotoxidez
H ₂ O + Tween	0% = Ausência de fitotoxidez
0,25%	0% = Ausência de fitotoxidez
0,50%	51 – 75% = alta necrose e clorose nas folhas
0,75%	51 – 75% = alta necrose e clorose nas folhas
1,0%	76 – 100% = murcha e ressecamento da planta
1,5%	76 – 100% = murcha e ressecamento da planta

Controle preventivo

No controle *in vivo* observou-se diferença significativa para o controle preventivo das doenças utilizando-se diferentes concentrações de óleo essencial (Tabela 3). O óleo essencial de *M. citrifolia* apresentou eficácia na prevenção dos sintomas das manchas de *Bipolaris* e *Exserohilum* em plantas de milho, com valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) nas concentrações de 0,05 e 0,25% inferiores aos valores observados nas plantas tratadas com o fungicida.

Tabela 3. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) por *Bipolaris maydis* e *Exserohilum turcicum*, utilizando-se diferentes concentrações de óleo essencial de *Morinda citrifolia* de forma preventiva. Gurupi-TO, 2016

Tratamentos	AACPD**	
	<i>B. maydis</i>	<i>E. turcicum</i>
Fungicida	168,00 a	162,33 a
0,0%	218,67 a	242,00 a
0,002%	207,83 a	214,67 a
0,01%	189,67 a	172,17 a
0,05%	116,50 ab	158,83 a
0,25%	41,33 b	35,67 b
CV (%)	17,01	16,64

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

*Dados originais foram transformados para \sqrt{x}

Os menores valores médios de AACPD, demonstrando uma menor severidade da doença, foram observados na concentração de 0,25% de óleo essencial, para ambos os fitopatógenos, não apresentando diferença estatística apenas da concentração de 0,05% para o *B. maydis* e diferindo estatisticamente dos demais tratamentos para o *E. turcicum*.

O tratamento em que foi pulverizado o fungicida Priori Xtra[®], não apresentou diferença estatística do tratamento controle. O que pode vir a ser um indicativo de que os fitopatógenos podem ter adquirido resistência ao produto, pois trata-se do principal fungicida utilizado para o controle de doenças foliares na cultura no milho.

Os valores de AACPD observados para o fitopatógeno *B. maydis* foram inferiores aos observados para o *E. turcicum*, demonstrando maior eficácia do óleo essencial de *M. citrifolia* no controle preventivo da mancha de *Bipolaris* e maior agressividade do fitopatógeno *E. turcicum*.

Na literatura tem-se observado estudos promissores quanto a aplicação do suco e extratos de frutos de *M. citrifolia* no controle de microrganismos patogênicos em mamíferos (CHAN-BLANCO et al., 2006; KRISHNAIAH et al., 2012; SAHOO et al., 2012), no entanto, não há relatos quanto a utilização do óleo essencial dos frutos em microrganismos fitopatogênicos.

O fruto de *Morinda citrifolia* L. apresentou potencial para produção de óleo essencial, e este possui atividade fungitóxica e fungicida, inibindo o crescimento micelial de *B. maydis* e *E. turcicum*, importantes fitopatógenos causadores de lesões foliares na cultura do milho. A concentração de 0,25% de óleo essencial mostrou-se eficiente minimizando a severidade da doença mancha de bipolaris e mancha de exserohilum em plantas de milho quando aplicado de forma preventiva.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.
- BARNETT, H.C.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3th ed. Mineapolis: Burgess Publishing, 1972, 241p.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446–475, 2008.
- BEARE-ROGERS, J.; DIEFFENBACHER, A.; HOLM, J.V. Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v.73, n.4 p.685-744, 2001.
- CANDIDA, T.; FRANÇA, J.P.; CHAVES, A.L.F.; LOPES, F.A.R.; GAIBA, S.; SACRAMENTO, C.K.; FERREIRA, L.M.; FRANÇA, L.P. Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda citrifolia* L. grown in Southeast Brazil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.29, n.2, p.10-14, 2014.
- CANUTO, G.A.B.; XAVIER, A.A.O.; NEVES, L.C.; BENASSI, M.T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.4, p.1196-1205, 2010.
- CHAGAS, J.F.R.; SANTOS, G.R.; COSTA, R.V.; COTA, L.V.; SILVA, D.D.; SIMON, J.; MOURÃO, D.S.C. Principais doenças foliares da cultura do milho no estado do Tocantins. **Embrapa - Circular Técnica**, n.213, p.1-13, 2015.
- CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A.M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J.M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.645-654, 2006.
- COGLIATTI, M.; JUAN, V.F.; BONGIORNO, F.; DALLA VALLE, H.; ROGERS, W.J. Control of grassy weeds in annual canary grass. **Crop Protection**, v.30, p.125-129, 2011.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – Safra 2015/2016**. Brasília, v.3, n.10, 2016.
- CORREIA, A.A.S.; GONZAGA, M.L.C.; AQUINO, A.C.; SOUZA, P.H.M.; FIGUEIREDO, R.W.; MAIA, G.A. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no Estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**, v.22, n.4, p.609-615, 2011.
- DE LIMA, C.R.; LIMA, R.A. Identificação de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico dos frutos verdes e maduros de *Morinda citrifolia* L. **Saúde e Pesquisa**, v.6, n.3, 2013.
- DEQUECH, S.T.B; RIBEIRO, L.P.; SAUSEN, C.D.; EGEWARTH, R.; KRUSE, N.D. Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica. **Revista da FZVA**, v.15, n.1, p.71-80, 2008.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, England. Cab International, 1971.
- FREITAS, S.P.; MOREIRA, J.G.; FREITAS, I.L.J.; FREITAS JÚNIOR, S.P; AMARAL JÚNIOR, A.T.; SILVA, V.Q.R. Fitotoxicidade de herbicidas a diferentes cultivares de milho-pipoca. **Planta Daninha**, v.27, p.1095-1103, 2009.

GARCÍA-VILAS, J.A.; QUESADA, A.R.; MEDINA, M.A. Damnacanthal, a noni anthraquinone, inhibits c-Met and is a potent antitumor compound against Hep G2 human hepatocellular carcinoma cells. **Scientific Reports**, v.5 p.1-9, 2015.

GUIMARÃES, L.G.L.G.; CARDOSO, M.G.; SOUSA, P.E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S.S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.464 – 472, 2011.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

KRISHNAIAH, D.; NITHYANANDAM, R.; SARBATLY, R. Phytochemical Constituents and Activities of *Morinda citrifolia* L. In: VENKETESHWER, R. (ed.). **Phytochemicals – A global perspective of their role in nutrition and health**. INTECH Open Access Publisher, p.127-150, 2012.

McCLATCHEY, W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v.1, n.2, p.110-120, 2002.

PALIOTO, G.F.; SILVA, C.F.G.; MENDES, M.P.; ALMEIDA, V.V.; ROCHA, C.L.M.S.C.; TONIN, L.T.D. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* L. (noni) cultivado no Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.59-66, 2015.

PAWLUS, A.D.; SU, B.N.; KELLER, W.J.; KINGHORN, A.D. An Anthraquinone with Potent Quinone Reductase-Inducing Activity and Other Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1720-1722, 2005.

PAWLUS, A.D.; KINGHORN, D.A. Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). **Journal Pharm Pharmacol**, v.59, p.1587-1609, 2007.

PINO, J.A.; MÁRQUEZ, E.; QUIJANO, C.E.; CASTRO, D. Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.) at two ripening stages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.1, p.183-187, 2010.

ROZWALKA, L.C.; ALVES, E.; AMARAL, D.C. Ultra structural study of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* treated with essential oils. **Interciencia**, v.35, n.12, P.912-915, 2010.

SANTOS, G.R.; CAFÉ-FILHO, A.C.; LEÃO, F.F.; CÉSAR, M.; FERNANDES, L.E. Progresso do crestamento gomoso e perdas na cultura da melancia. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.228-232, 2005.

SHANER, G.; FINNEY, R.F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.67, n.8, p.1051-1056, 1977.

SAHOO, K.; DHAL, N.K.; SAHOO, S.L.; LENKA, S.S. Comparative phytochemical and antimicrobial study of *Morinda Pubescens* SM. and *Morinda citrifolia* L. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.3, p. 425-429, 2012.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

WANG, M.Y.; WEST, B.J. JENSEN, C.J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A.K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.23, n.12, p.1127-1141, 2002.

WEI, G.J.; HO, C.T.; HUANG, A.S. Analysis of volatile compounds in noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) juice by steam distillation-extraction and solid phase microextraction coupled with CG/AED and CG/MS. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.19, n.1, p.33-39, 2011.

CAPITULO III

ÓLEO ESSENCIAL DE *Morinda citrifolia* L. COMO SUBSTÂNCIA ELICITORA NA SÍNTESE DE ENZIMAS INDUTORAS DE RESISTÊNCIA DE DOENÇAS EM PLANTAS DE MILHO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Morinda citrifolia* L. COMO SUBSTÂNCIA ELICITORA NA SÍNTESE DE ENZIMAS INDUTORAS DE RESISTÊNCIA DE DOENÇAS EM PLANTAS DE MILHO

RESUMO

A utilização de óleos essenciais e seus princípios ativos como medida alternativa no controle de fitopatógenos, tem se destacado no meio científico, levando ao teste de óleos essenciais de diversas espécies vegetais. Além da atividade antifúngica direta observada nas substâncias de origem vegetal, tem se pesquisado o potencial de tais substâncias como elicitoras, capazes de estimular respostas de defesa, ativando mecanismos latentes de resistência das plantas. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o potencial do óleo essencial de frutos maduros de *M. citrifolia* na indução de síntese de fitoalexinas e enzimas de indução de resistência em plantas de milho (*Zea mays* L.). Observou-se que o óleo essencial de *M. citrifolia* à concentração de 0,25% apresentou potencial de indução de síntese de deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo (0,343) e milho (0,045), e gliceolina em cotilédones de soja (1,024), com valores de absorbância superiores aos apresentados por ativadores vegetais de comprovada atividade. Em plantas de milho pulverizadas com diferentes concentrações de óleo essencial de *M. citrifolia* verificou-se a indução de atividade enzimática de Ascorbato peroxidase (APX), Peroxidase de fenóis (POX), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Quitinase (QUI), importantes enzimas envolvidas nos mecanismos de resistência às doenças de plantas.

Palavras chave: *Morinda citrifolia*, *Zea mays*, Controle biológico, Fitoalexinas

***Morinda citrifolia* L. ESSENTIAL OIL AS ELICITOR SUBSTANCE IN SYNTHESIS OF ENZYMES INDUCING DISEASE RESISTANCE IN MAIZE PLANTS**

ABSTRACT

Using essential oils and their active principles as alternative measure in the control of phytopathogens, has excelled in the scientific means taking the test of essential oils of several plant species. Besides the direct antifungal activity observed in plant substances, has researched the potential of such substances as inducers, able to stimulate defense responses by activating latent resistance mechanisms of plants. Thus, the aim of this study was to investigate the essential oil potential of ripe fruit of *Morinda citrifolia* L. on phytoalexin synthesis and antioxidative enzymes of induction in maize plants. Observed that the essential oil from *M. citrifolia* presented potential of deoxyanthocyanidin synthesis induction in mesocotyls sorghum and maize, and soybean cotyledons gliceolin, with absorbance values higher than those presented by vegetable activator with confirmed activity. In maize plants sprayed with different concentrations of essential oil *M. citrifolia* found to induction of enzyme activity of ascorbate peroxidase (APX), phenols peroxidase (POX), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Chitinase (QUI) important enzymes involved in resistance mechanisms of plant disease.

Keywords: *Morinda citrifolia* L., *Zea mays* L., Biological control, Phytoalexins.

INTRODUÇÃO

O controle biológico de doenças em plantas tem se destacado com a utilização de óleos essenciais, que são substâncias sintetizadas a partir do metabolismo secundário de plantas medicinais, aromáticas e condimentares, desempenhando a função de defesa em tais espécies. Nas últimas décadas, estas substâncias de origem vegetal têm despertado o interesse de diversos ramos da ciência, principalmente como fonte de novas moléculas de interesse econômico (MAREI et al., 2012; SHAABAN et al., 2012).

Na agricultura, os óleos essenciais têm sido testados no controle alternativo de doenças, apresentando resultados promissores contra fitopatógenos (AMINI et al., 2012), existindo a necessidade de abordagens adicionais para o controle de doenças de plantas, considerando que a indução de resistência tem oferecido uma perspectiva de controle durável de doenças de amplo espectro utilizando a própria defesa da planta (WALTERS et al., 2013). Os óleos essenciais podem apresentar potencial como indutores de resistência à doenças em culturas de interesse econômico, como por exemplo, a cultura do milho, que tem apresentado elevados índices de perdas na produção devido a presença de doenças foliares.

Por se tratar de organismos fixos, as plantas são capazes de responder a estresses abióticos ou bióticos, ativando mecanismos de defesa pré e/ou pós-formados, em sucessivos eventos e sinais bioquímicos. Estes sinais vão desde o reconhecimento do agente agressor até a ativação de barreiras físicas e químicas de proteção, induzidos a partir de alterações significativas no metabolismo primário e secundário (ALMEIDA et al., 2012; O'BRIEN et al., 2012). Um dos mecanismos adotados pelas células vegetais é intensificar sua atividade enzimática com a síntese de enzimas antioxidativas, dentre elas a superóxido dismutase (SOD, E.C 1.15.1.1), a ascorbato peroxidase (APX, E.C 1.11.1.11), a catalase (CAT, E.C 1.11.1.6), peroxidase (POX, E.C 1.11.1.7) e quitinase (QUI, E.C 3.2.1.14) (GILL e TUTEJA, 2010; BETTINI et al., 2014).

O estresse oxidativo ocorre quando espécies reativas de oxigênio não são rapidamente eliminadas e a taxa de reparação de componentes celulares danificados não consegue manter o ritmo com a taxa de danos. A persistência dessa situação pode levar a danos irreversíveis com perda das competências fisiológicas e eventual morte celular. No entanto, a produção de espécies reativas de oxigênio, resultantes de tensões ambientais moderadas, dentro da gama adaptativa da planta, têm importantes funções de sinalização local e sistêmicas. Nestas circunstâncias, a produção de espécies reativas de oxigênio induzem mecanismos de defesa que protegem a planta sem resultar em estresse oxidativo (MULLINEAUX e BAKER, 2010).

As alterações nas atividades enzimáticas das plantas permitem acompanhar o estado de indução de resistência, quando expostas às condições de estresse. Uma cadeia de antioxidantes

enzimáticos e não enzimáticos em conjunto com sistemas de reparação celular formam uma complexa defesa contra o estresse oxidativo e regula a sinalização de estresse (DEMIDCHIK, 2015). Devido os compostos secundários presentes também em plantas medicinais desempenharem funções importantes em interações planta-patógeno, por meio da ação antimicrobiana direta ou ativando mecanismos de defesa de outras plantas que venham a ser tratadas com esses compostos (BONALDO et al., 2004), os óleos essenciais podem ser uma alternativa para indução de resistência a doenças em plantas cultivadas. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi verificar o potencial do óleo essencial de frutos maduros de *M. citrifolia* na indução de síntese de fitoalexinas e enzimas de indução de resistência em plantas de milho (*Zea mays* L.).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e no Laboratório de Controle Biológico de Doenças da Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi.

Para a síntese de fitoalexinas foi adotada metodologia adaptada de Bonaldo et al. (2004). Os bioensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os tratamentos consistiram de quatro concentrações de óleo essencial de *M. citrifolia* (0,002; 0,01; 0,05; 0,25%) e duas testemunhas: aplicação de apenas água destilada e aplicação dos ativadores de defesa vegetal, Phytogard e Yantra (0,1%).

Síntese de fitoalexina deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo e milho

Sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e milho (*Zea mays* L.) foram desinfectadas em hipoclorito de sódio (1%) por 15 minutos, lavadas em água destilada, distribuídas e enroladas em folhas de papel germitest umedecido com água destilada e esterilizada, incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após quatro dias de incubação, as plântulas formadas foram expostas a luz por quatro horas para paralisar a alongação dos mesocótilos, que em seguida, foram excisados pesados e colocados em tubos de ensaio (três mesocótilos por tubos) contendo 1 mL de cada concentração de óleo essencial e as soluções dos ativadores de defesa vegetal. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmara úmida a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob luz fluorescente por 60 horas. Posteriormente, os mesocótilos foram retirados dos tubos, eliminados os 5 mm basais e a porção superior pesada, cortada em pequenos segmentos e colocada em tubos eppendorf contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v) e mantidos a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no metanol para a extração dos pigmentos. Após 96 horas foram efetuadas as leituras da absorbância das amostras no comprimento de onda de 480 nm em espectrofotômetro. Os dados foram expressos em valores de absorbância e quanto maior os valores das leituras de absorbância observados nas amostras maior a síntese de fitoalexinas.

Síntese de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja

Plântulas de soja (*Glycine max* L., variedade M-SOY 9144) foram cultivadas em bandejas contendo areia esterilizada como substrato. Após 15 dias da semeadura, os cotilédones foram destacados das plântulas, lavados em água destilada, enxugados, pesados e cortados em pequenos seguimentos de aproximada de 1 mm de espessura. Quatro cotilédones foram colocados em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada e esterilizada. Aplicou-se sobre os cotilédones uma alíquota de 75 μL de cada concentração de óleo essencial, água destilada e soluções de ativadores de defesa vegetal: Phytogard e Yantra. As placas de Petri foram mantidas em câmara escura à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e após 20 horas, os cotilédones foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de água destilada esterilizada e levados a agitação em centrifuga à 4000 rpm

por 30 minutos, para extração da fitoalexina formada. Em seguida, as amostras foram submetidas à leitura de absorvância sobre o comprimento de onda de 285 nm. Os dados foram expressos em valores de absorvância.

Síntese de fitoalexina deoxiantocianidina em plantas de milho

Para determinar a síntese de fitoalexinas em folhas de plantas de milho utilizou-se metodologia adaptada a partir da metodologia para a síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo segundo Bonaldo et al. (2004).

Plantas de milho foram cultivadas em vaso com capacidade de dois litros, contendo como substrato latossolo vermelho amarelo mais esterco bovino na proporção 2:1. Aos 35 dias após a semeadura, as plantas foram pulverizadas com 20 mL de solução de diferentes concentrações de óleo essencial, água destilada e os ativadores vegetais Phytogard e Yantra, e mantidas em câmara úmida à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após 24 horas, coletou-se quatro folhas de cada planta, que em seguida, foram lavadas com água destilada, secadas com papel toalha, cortadas em pequenos fragmentos, pesados e colocados em microtubos tipo eppendorf de 2 mL, contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl, v/v). As amostras foram mantidas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 96 horas para extração dos pigmentos e a absorvância determinada a 480 nm.

Atividade enzimática em plantas de milho submetidas a doses crescentes de óleo essencial de *M. citrifolia*

Para determinação da atividade enzimática adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (quatro concentrações de óleo essencial de *M. citrifolia*: 0,002; 0,01; 0,05 e 0,25%; e uma testemunha, com a aplicação de apenas água destilada – 0,0%), conduzidos em triplicata.

Plantas de milho foram cultivadas em vaso com capacidade de dois litros, contendo como substrato latossolo vermelho-amarelo mais esterco bovino na proporção 2:1. Foram mantidas três plantas por vaso, irrigadas diariamente com auxílio de regador manual.

Preparou-se uma solução estoque de óleo essencial a 1%, utilizando-se como agente dispersante uma solução de Tween 80 a 1%. A partir da solução estoque de óleo essencial foram realizadas diluições para obtenção das demais concentrações. Aos 30 dias, após semeadura, as plantas foram pulverizadas com 20 mL das soluções com o auxílio de borrifador manual. Em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida a 25°C por 24 horas. Após o período de incubação, foram coletadas aleatoriamente, três folhas das plantas de milho em cada tratamento como amostras para o preparo dos extratos vegetais utilizados na determinação da atividade

enzimática pós-inoculação do óleo essencial de *M. citrifolia*, seguindo metodologias adaptadas a partir de GIANNOPOLITIS e RIES (1977), NAKANO e ASADA (1981), HAVIR e McHALE (1987); BOAVA et al. (2010), ARAUJO e STADNIK (2013); BETTINI et al., 2014.

Para o preparo dos extratos, foram pesados 200 mg de folha coletada em cada tratamento, maceradas separadamente em nitrogênio líquido com 50% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Em seguida, foram adicionados às amostras, 375 µL de tampão fosfato de potássio 400 mM, pH 7,8; 15 µL de EDTA 10 mM; 75 µL de ácido ascórbico 200 mM e 1,035 mL de água destilada esterilizada. Os extratos foram centrifugados a 13000 g por 10 min à 4°C e os sobrenadantes coletados e armazenados em freezer à -20°C para posterior quantificação da atividade enzimática.

A quantificação da proteína total foi realizada segundo Bradford (1976). Em tubos de ensaio foram adicionados 50 µL de extrato de folhas de milho e 1,5 mL do corante Bradford (Quick Start™ Bradford 1x), agitados em agitador de tubos e incubados no escuro por cinco minutos. Em seguida, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína foi determinada utilizando-se curva padrão, preparada com albumina sérica bovina (BSA), variando de 0 a 100 µg·mL⁻¹. Os resultados foram expressos em µg·mL⁻¹ para proteínas totais, e as demais enzimas, APX, POX, SOD, CAT e QUI, expressas em µg de proteína·min⁻¹.

A ascorbato peroxidase (APX) foi determinada ao comprimento de onda de 290 nm à 25°C pela degradação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A mistura de reação foi constituída por 100 µL da amostra de extrato vegetal; 2,7 mL de tampão de ascorbato 0,5 mM; e 200 µL de solução de peróxido de hidrogênio 30 mM.

A atividade da peroxidase de fenóis (POX) foi determinada à 25°C, através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol à 470 nm. A mistura da reação continha 0,05 mL do extrato proteico e 2,55 mL de solução com 0,5 mL de guaiacol 0,2 M e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio a 0,38 M e 2,0 mL de tampão acetato de sódio 0,02 M (pH 5,0).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada à 560 nm. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,1 mL de extrato vegetal; 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8; 0,02 mL de EDTA 0,1 mM; 0,4 mL de L-metionina 14 mM; e 0,2 mL de NBT 0,1 µM. A reação foi iniciada pela adição de 0,02 mL de riboflavina 2 µM. Os tubos de ensaio foram iluminados por cinco minutos. Foram preparados dois brancos com o tampão de incubação sem a amostra: um protegido da luz, utilizado para zerar o espectrofotômetro e o outro exposto a iluminação juntamente com as amostras, utilizado para determinar a fotoredução total do NBT.

Para a determinação da atividade da catalase (CAT) adicionou-se 0,05 mL de extrato vegetal e 2,95 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, suplementado com solução de H₂O₂ à 20 mM. Acompanhou-se o decaimento da leitura da absorbância ao comprimento de onda de 240 nm por cinco minutos, com leituras a cada 30 segundos.

A atividade enzimática de quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Quitin-RBV 4 mg mL⁻¹), determinada à 550 nm. Adicionou-se 0,2 mL do extrato proteico; 0,6 mL do tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0; e 0,2 mL de “CM-chitin- RBV” (2,0 mg mL⁻¹). Em seguida, incubou-se a amostra à 40°C por 20 minutos, paralisando a reação com a adição de 0,2 mL de solução de HCL 1 M, levando ao resfriamento em banho de gelo e centrifugação à 10000 g por cinco minutos.

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e de regressão com base nos coeficientes a 5 ou 1% de probabilidade, utilizando o programa estatístico ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese de fitoalexinas

Os resultados demonstram que o óleo essencial de *Morinda citrifolia* induziu a síntese de fitoalexinas do tipo deoxiantocianidinas e gliceolinas (Tabela 1). A síntese de fitoalexinas apresentou diferença estatística entre os tratamentos avaliados, tanto em mesocótilos de plântulas de sorgo e milho quanto em folhas de plantas de milho e cotilédones de plântulas de soja.

Tabela 1. Deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e milho (*Zea mays* L.) e plantas de milho, e gliceolina em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de óleo essencial de *Morinda citrifolia* L. (0,0, 0,002, 0,01, 0,05 e 0,25%) e dois ativadores de defesa vegetal (Phytogard[®] e Yantra[®]). Gurupi-T0, 2016

Tratamentos	Sorgo	Milho	Folhas de Milho	Soja*
Phytogard	0,414 a	0,050 a	0,594 c	0,363 c
Yantra	0,302 b	0,047 a	0,497 cd	0,339 c
0,0	0,108 c	0,020 c	0,465 d	0,361 c
0,002	0,131 c	0,020 c	0,519 cd	0,413 c
0,01	0,134 c	0,022 c	0,804 b	0,581 b
0,05	0,197 c	0,030 bc	1,269 a	0,668 b
0,25	0,343 ab	0,045 ab	1,217 a	1,024 a
CV (%)	17,01	21,15	6,95	9,03

*Indução de gliceolina.

Média seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Em mesocótilos de sorgo a síntese de deoxiantocianidinas apresentou diferença estatística entre as diferentes concentrações de óleo essencial e os ativadores vegetais Phytogard e Yantra, exceto com a concentração de 0,25%, que apresentou diferença estatística das demais concentrações de óleo essencial.

Os bioensaios utilizando mesocótilos de sorgos são empregados como modelo padrão de estudo apresentando metodologia estabelecida, sendo conhecidas as fitoalexinas flavonóides-3-deoxiantocianidinas, luteolinidina, apigeninidina, éster do ácido caféico de arabinosil 5-O-apigeninidina e 5-metoxiluteolinidina (NICHOLSON et al., 1988; MEINEZ et al., 2014).

Adotando a mesma metodologia aos mesocótilos de sementes de milho, observou-se uma modesta síntese de deoxiantocianidinas com valores de absorvância variando de 0,002 a 0,050. A maior síntese de fitoalexinas foi observado nos tratamentos com os ativadores vegetais Phytogard

(0,050) e Yantra (0,047) que não apresentaram diferença estatística entre si e entre a concentração de 0,25% de óleo essencial. Provavelmente as concentrações inferiores de óleo essencial estariam muito diluídas não diferindo estatisticamente do tratamento testemunha, em que não houve aplicação de óleo essencial de *M. citrifolia*.

Em plantas de milho, as concentrações de 0,05 e 0,25% de óleo essencial diferiam estatisticamente dos demais tratamentos apresentando os maiores valores de absorvância, demonstrando o potencial do óleo essencial de *M. citrifolia* como substância elicitadora de resposta de defesa em plantas. Os ativadores vegetais apresentaram valores baixos, não diferindo estatisticamente entre si. No entanto, o Yantra não diferiu estatisticamente do tratamento sem aplicação de óleo essencial e das concentrações de 0,002 % e 0,01%.

O óleo essencial de *M. citrifolia* estimulou a síntese de gliceolina em cotilédones de plântulas de soja, apresentando diferença estatística entre a concentração de 0,25% das demais concentrações, Phytogard e Yantra. A partir da concentração de 0,01% de óleo essencial observou-se significativa indução de gliceolina. Houve baixa indução de fitoalexinas pelos ativadores vegetais que não diferiram estatisticamente do tratamento sem aplicação de óleo essencial.

A gliceolina é uma importante fitoalexina na interação da soja com fitopatógenos, uma vez que a utilização de cotilédones dessa oleaginosa tem se mostrado uma importante ferramenta nos estudos envolvendo a atividade elicitadora de moléculas de origem biótica e abiótica (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000; MAZARO et al., 2008).

Na Figura 1, observou-se que a indução de fitoalexinas ajustaram-se ao modelo linear, apresentando coeficientes de determinação variando de 79% a 90%. Houve maior síntese de deoxiantocianidinas em folhas de plantas de milho, com acréscimo médio na indução da fitoalexina de aproximadamente 0,225. No entanto, os mesocótilos de sorgo e milho apresentaram valores inferiores, com acréscimo na indução da fitoalexina de aproximadamente 0,054 e 0,006, respectivamente. Possivelmente, esta resposta se deve ao maior número e maior especificidade das células do limbo foliar, em relação às células do mesocótilo de sorgo e milho.

Os resultados demonstram que o óleo essencial de *M. citrifolia* possui em sua composição química moléculas com potencial de ativação de mecanismos de defesa em plantas de milho, estimulando a síntese e levando ao acúmulo de fitoalexinas, indicando a presença de moléculas com característica elicitadora.

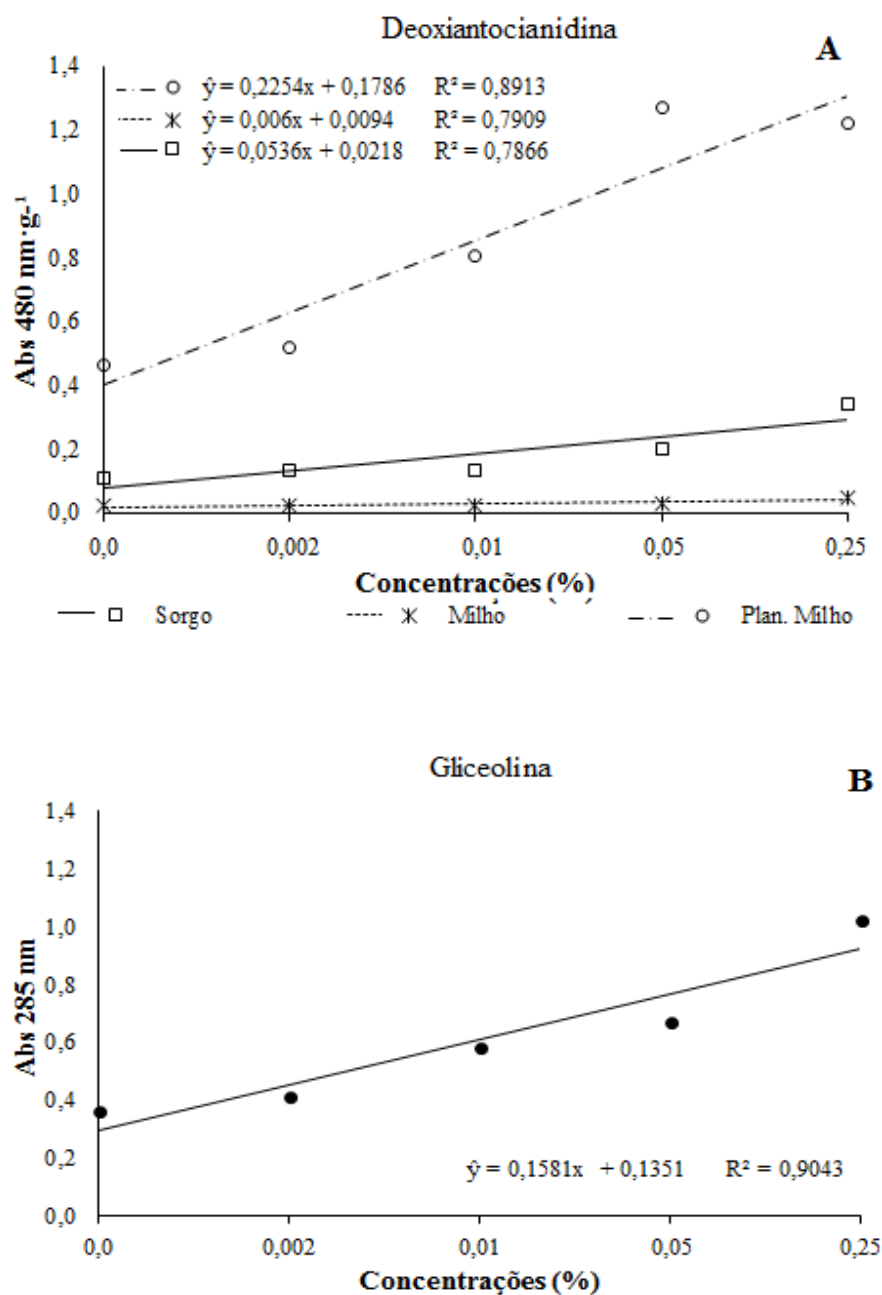


Figura 1. Indução de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e milho (*Zea mays* L.) e em plantas de milho (A); e indução de gliceolina em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) (B), submetidos a diferentes concentrações de óleo essencial de *Morinda citrifolia* L. (0,0, 0,002, 0,01, 0,05 e 0,25 %), Gurupi-T0, 2016

Atividade enzimática

O óleo essencial de *M. citrifolia* apresentou potencial como substância elicitadora, estimulando a síntese das enzimas antioxidantes APX, POX, SOD, CAT e QUI. As plantas de milho pulverizadas com óleo essencial de *M. citrifolia* apresentaram concentração proteica e atividade

enzimática relacionada à indução de resistência com respostas discrepantes em função da aplicação das diferentes concentrações de óleo essencial.

O teor de Proteínas Totais (Figura 2A) ajustou-se ao modelo quadrático, apresentando os maiores valores entre as concentrações de 0,002 e 0,01% de óleo essencial, com significativo decréscimo na maior concentração testada, a 0,25%.

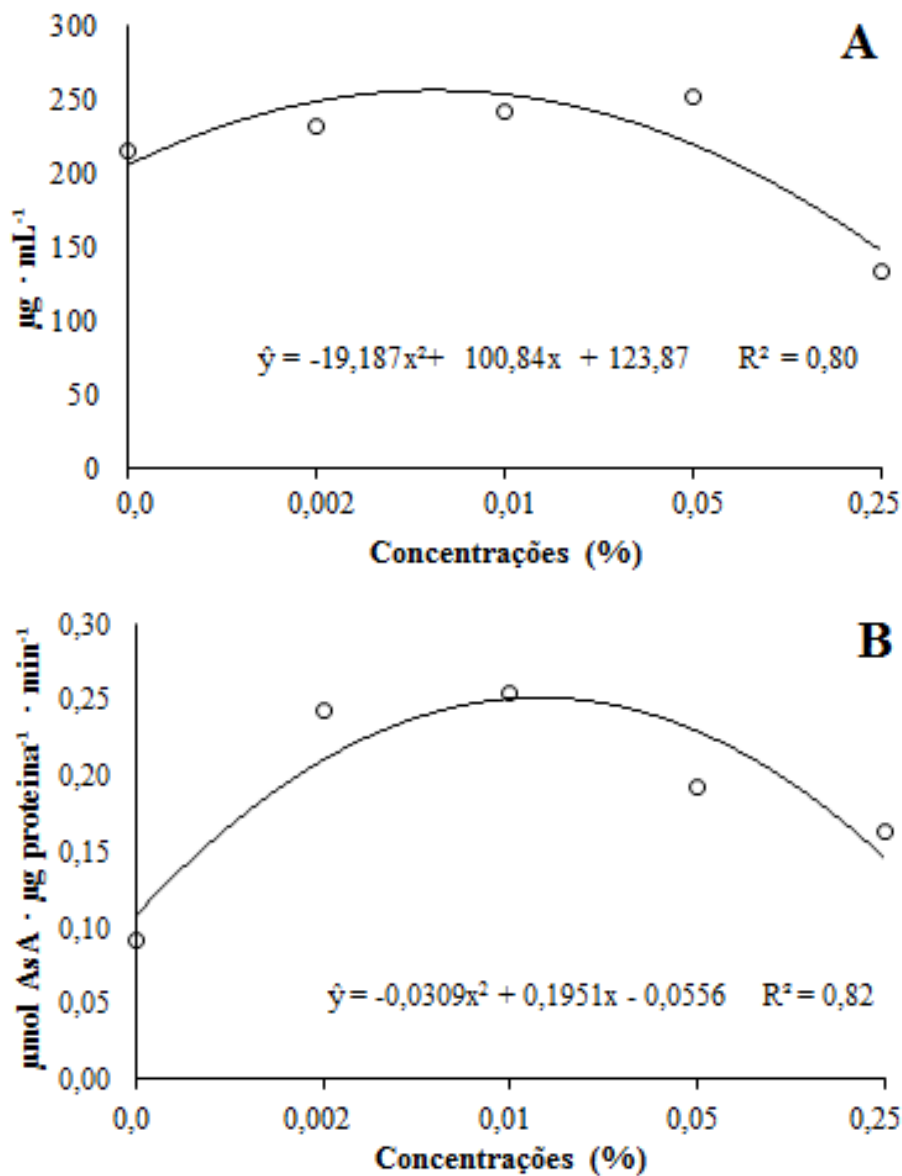


Figura 2. Proteínas Totais (A) e atividade enzimática de Ascorbato Peroxidase (B), a partir de folhas de plantas de milho pulverizadas com diferentes concentrações de óleo essencial de *Morinda citrifolia* L.

Quando não houve aplicação de óleo essencial, a síntese de proteínas totais apresentou valor médio de aproximadamente 124 µg · mL⁻¹ de extrato foliar. Segundo Taiz e Zeiger (2013) o acúmulo de compostos contendo nitrogênio, como por exemplo os aminoácidos, é um processo comum em

plantas submetidas a estresses ambientais. Entretanto, dependendo da intensidade do estresse e da espécie envolvida os níveis de tais compostos podem apresentar decréscimos.

Houve ajuste quadrático para a atividade enzimática da APX (Figura 2B), com o maior valor observado à 0,01% de óleo essencial, demonstrando que elevadas concentrações do óleo essencial podem desativar a via que envolve a síntese dessa enzima. Segundo MARUTA et al. (2016) as enzimas Ascorbato Peroxidases funcionam não só como enzimas antioxidantes clássicas, impedindo danos oxidativos em células vegetais, mas também como moduladores de sinais de degradação de H_2O_2 , ajustando as respostas aos estresses bióticos e abióticos. Característica, que segundo os mesmos autores, pode ser aplicável às demais enzimas envolvidas no metabolismo de espécies reativas de oxigênio.

Dentre as enzimas avaliadas, a que apresentou maiores concentrações foi a POX (Figura 3A), variando de $0,48 \mu\text{mol ASA} \cdot \mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ à 0,002% de óleo essencial até $1,64 \mu\text{mol ASA} \cdot \mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ à 0,25%, ajustando-se ao modelo linear positivo com incremento de aproximadamente $0,34 \mu\text{mol ASA} \cdot \mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ por unidade de acréscimo na concentração de óleo essencial. A atividade das peroxidases frequentemente aumenta em resposta a estresses, pois tratam-se de glicoproteínas antioxidantes, capazes de catalisar grande número de reações, como a produção ou a catálise de H_2O_2 , a formação de lignina, o catabolismo de auxinas e a cicatrização de ferimentos (RESENDE et al., 2003).

Segundo Boava et al. (2010) uma das funções das peroxidases é a formação da lignina pela polimerização de fenóis. Assim sendo, é esperado que alterações na atividade de peroxidases envolvam também alterações na atividade de outras enzimas presentes na mesma rota metabólica. Portanto, as peroxidases são usadas em estudos de indução de resistência, como uma das muitas respostas de defesa manifestadas pelas plantas.

A atividade enzimática da SOD (Figura 3B) apresentou comportamento discrepante em função do aumento das concentrações de óleo essencial, apresentando os maiores valores para as concentrações mínima (0,002%) e máxima (0,25%) de óleo essencial testadas, com aproximadamente $0,14 \mu\text{mol ASA} \cdot \mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para ambas as concentrações. A SOD é considerada como a primeira enzima na linha de defesa aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. Ela atua dismutando o \bar{O}_2 em H_2O_2 , interferindo na concentração destes, participando do mecanismo central de defesa, evitando a formação do radical OH^- (ALSCHER et al., 2002; LEÓN et al., 2002).

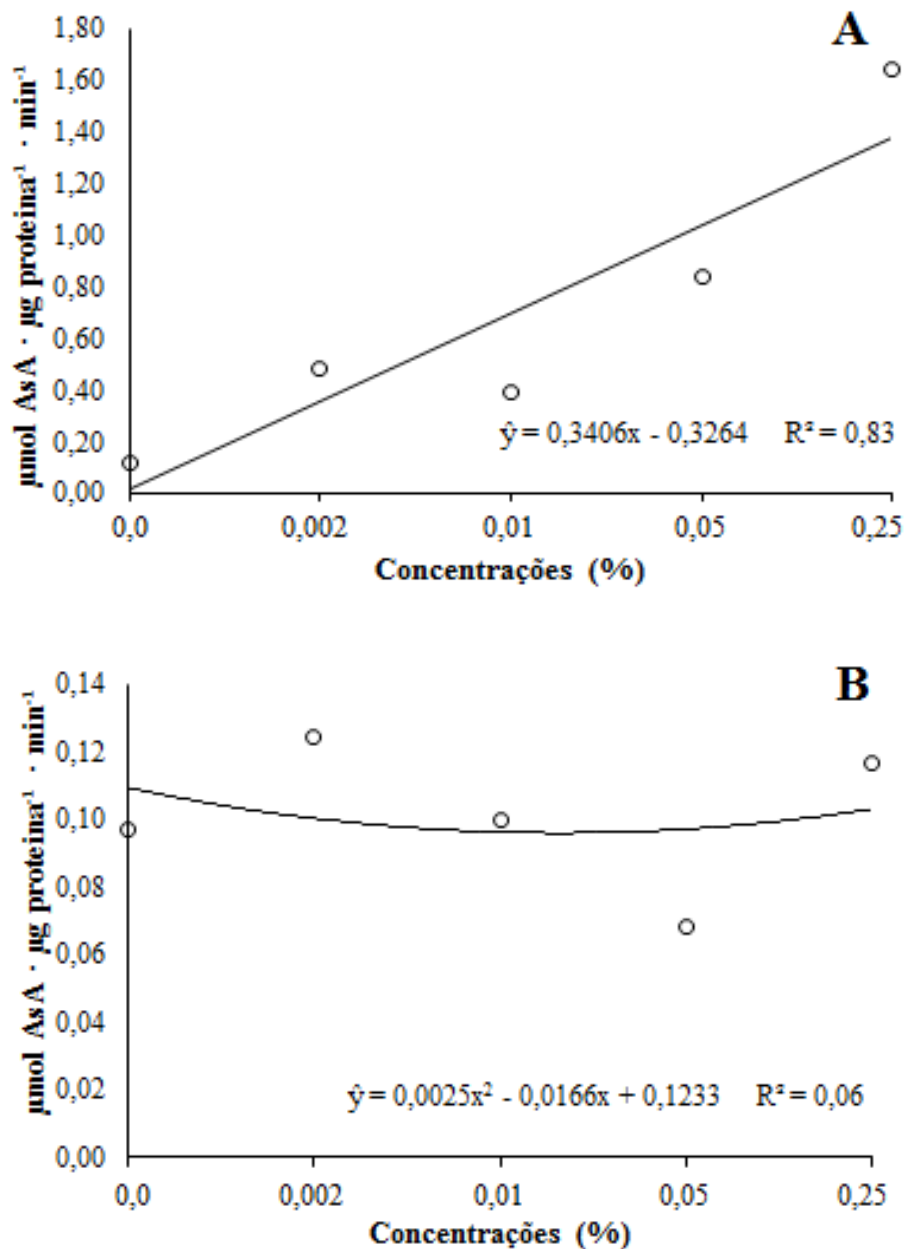


Figura 3. Peroxidase de Fen\u00f3is (A), Super\u00f3xido dismutase (B), a partir de folhas de plantas de milho pulverizadas com diferentes concentra\u00e7\u00f5es de \u00f3leo essencial de *Morinda citrifolia* L.

A CAT (Figura 4A) apresentou comportamento discrepante quanto a atividade enzim\u00e1tica, sendo que o modelo quadr\u00e1tico foi o que melhor se adequou, gerando um coeficiente de determina\u00e7\u00e3o de aproximadamente $R^2=60\%$. Na maior concentra\u00e7\u00e3o de \u00f3leo essencial testada houve decr\u00e9scimo na atividade enzim\u00e1tica com valor inferior ao valor observado nas plantas que n\u00e3o foram inoculadas com \u00f3leo essencial. Segundo Feierabend, (2005) a CAT destaca-se por apresentar elevada atividade, mas baixa afinidade com o H_2O_2 , oferecendo-se como ferramenta eficiente para a remo\u00e7\u00e3o e controle dos n\u00edveis elevados de H_2O_2 nas c\u00e9lulas. No entanto, n\u00e3o apresenta boa atividade, quando este se encontra em baixas concentra\u00e7\u00f5es. A CAT tem a vantagem de n\u00e3o

depender de qualquer agente redutor adicional para eliminação de H_2O_2 o que representa uma grande vantagem.

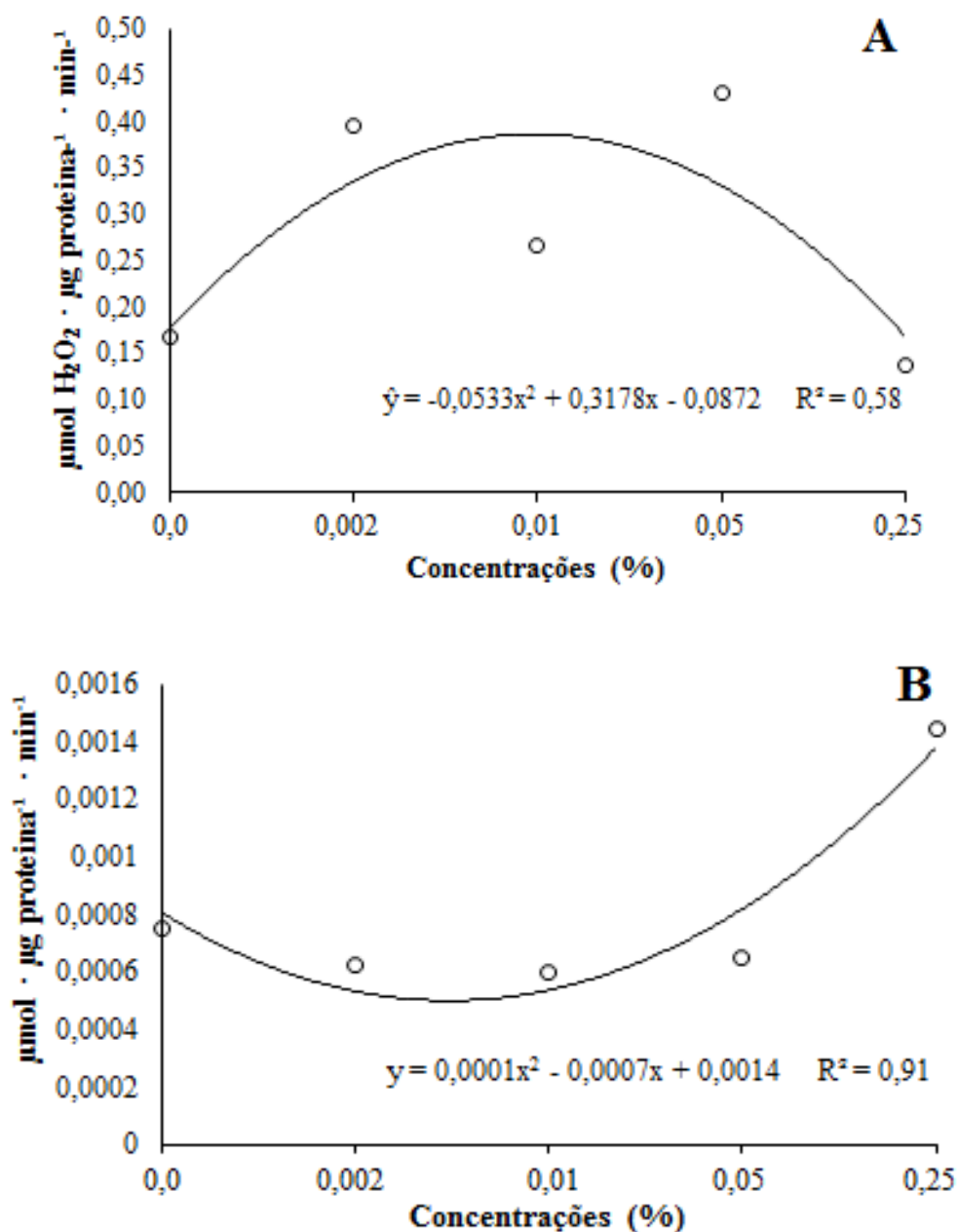


Figura 4. Catalase (A), Quitinase (B), a partir de folhas de plantas de milho pulverizadas com diferentes concentrações de óleo essencial de *Morinda citrifolia* L.

A QUI (Figura 4B) foi a enzima que apresentou menores valores para atividade enzimática, variando de 0,00075 à 0,0% (plantas não pulverizadas com óleo essencial) até 0,00145 à 0,25%, ajustando-se ao modelo quadrático com coeficiente de determinação de aproximadamente 91%. A QUI em plantas é uma importante enzima componente do sistema de defesa, não apenas por inibir o crescimento de fitopatógenos, causando a dissolução das paredes celulares fúngicas, mas também,

por ser capaz de liberar oligômeros de quitina que provocam outras importantes reações de defesa celular, como a produção de compostos fenólicos e o aumento na biossíntese de lignina (MOURA GUERRA et al., 2013).

A utilização de óleos essenciais no controle biológico de doenças em plantas tem apresentado resultados promissores, uma vez que, estes metabolitos secundários atuam diretamente sobre a célula dos fitopatógenos, promovendo severos danos como a desorganização e degradação celular (ROZWALKA et al. 2010). No entanto, não se pode desconsiderar o potencial dessas substâncias quanto promotoras de resistência, induzindo a síntese de enzimas antioxidantes relacionadas a defesa vegetal.

Apesar de não haver na literatura informações sobre o estímulo indutor do óleo essencial de *M. citrifolia* na ativação de mecanismos de defesa da planta contra fitopatógenos, os resultados do presente estudo demonstraram que o óleo essencial dessa espécie apresentou efeito elicitor de fitoalexinas e potencial como ativador de síntese das enzimas antioxidativas Ascorbato peroxidase, Peroxidase de fenóis, Superóxido dismutase, Catalase e Quitinase.

A indução de síntese de enzimas antioxidativas por óleos essenciais pode estar diretamente relacionada aos resultados relevantes observados em trabalhos que avaliam o efeito preventivo de óleos essenciais no controle de doenças de plantas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, H.O.; BARBOSA, M.O.; MARQUES, A.E.; PEREIRA, T.H.A.; JÚNIOR, M.J.M.; TESSAROLLO, N.G.; GAMES, P.D.; BARROS, E.G.; STOLF-MOREIRA, R.; GUIMARÃES, F.C.M.; ABDELNOOR, R.V.; PEREIRA, P.R.G.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.2, p.163-172, 2012.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1331-1341, 2002.
- AMINI, M.; SAFAIE, N.; SALMANI, M. J.; SHAMS-BAKHSH, M. Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. **Trakia Journal of Sciences**, v.10, n.1, p.1-8, 2012.
- ARAÚJO, L.; STADNIK, M.J. Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases. **Acta Scientiarum – Agronomy**, v.35, n.3 p.287-293, 2013.
- BETTINI, M.O.; COSCOLIN, R.B.S.; BRESSAN, D.F.; GOMES, E.R.; BROETTO, F. Enzimas antioxidativas em tecidos vegetais. In: BROETTO, F. (Coordenador). **Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas**. Botucatu: IBB/UNESP, Cultura Acadêmica, p. 23-28, 2014.
- BOAVA, L.P.; KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO R.M.; FURTADO, E.L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.168-172, 2010.
- BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TESSMANN, D.J.; SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.128-134, 2004.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v.109, p.212-228, 2015.
- FEIERABEND, J. Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defense. In: SMIRNOFF, N. (Ed.) **Antioxidants and reactive oxygen species in plants**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005, p.101-140.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v.59, n.2, p.309-314, 1977.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.

LEÓN AM, PALMA JM, CORPAS FJ, GOMEZ M, ROMERO-PUERTAS MC, CHATTERJEE D, MATEOS RM, DEL RIO LA, SANDALIO LM. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.813-820, 2002.

MAREI, G.I.Kh.; RASOUL, M.A.A.; ABDELGALEIL, S.A.M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide biochemistry and physiology**, v.103, n.1, p.56-61, 2012.

MARUTA, T.; SAWA, Y.; SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T. Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? **Plant and Cell Physiology**, p. pcv203, 2016.

MAZARO, S.M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S.S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciencia Rural**, v.38, n.7, p.1824-1829, 2008.

MEINERZ, C.C.; MULLER, S.F.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PORTZ, R.L.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Elicidores protéicos e glicídicos de *Adiantum capillus-veneris* L. para fitoalexinas em sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.4, p.794-803, 2014.

MOURA GUERRA, A.M.N.; RODRIGUES, F.Á.; BERGER, P.G.; BARROS, A.F.; RODRIGUES, Y.C.; LIMA, T.C. Resistência do algodoeiro à ferrugem tropical potencializada pelo silício. **Bragantia**, v.72, n.3, p.279-291, 2013.

MULLINEAUX, P.M.; BAKER, N.R. Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? **Plant Physiology**, v.154, n.2, p.521-525, 2010.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen-peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach-chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NICHOLSON, R.L.; JAMIL, F.F.; SNYDER, B.A.; LUE, W.L.; HIPSKIND, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.33, p.71-278, 1988.

O'BRIEN, J.A.; DAUDI, A.; BUTT, V.; BOLWELL, G.P. Reactive oxygen species and their role in plant defense and cell wall metabolism. **Planta**, v.236, p.765-779, 2012.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p.123-130. 2003.

ROZWALKA, L.C.; ALVES, E.; AMARAL, D.C. Ultra structural study of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* treated with essential oils. **Interciencia**, v.35, n.12, P.912-915, 2010.

SHAABAN, H.A.E.; EL-GHORAB, A.H.; SHIBAMOTO, T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. **Journal of Essential Oil Research**, v.24, n.2, p.203-212, 2012.

SHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v.30, n.12, p.129-137, 2000.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Artmed, 2013, 954p.

WALTERS, D.R.; RATSEP, J.; HAVIS, N.D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v.64, n.5, p.1263-1280, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais demonstraram efeitos promissores no controle de fitopatógenos. As espécies *Cymbopogon nardus* L., *Ocimum basilicum* L., *Copaifera* sp. e *Morinda citrifolia* L. apresentam na constituição química de seus óleos essenciais, compostos com potencial de aplicação agrônômica no controle de fungos associados às condições de armazenamento e patogênicos às plantas.

O presente estudo demonstrou que, embora não exista relatos quanto a utilização do óleo essencial de *M. citrifolia*, os frutos maduros desta espécie apresentam potencial para produção de óleo essencial com atividade biológica capaz de comprometer o crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos. Quando utilizado em testes *in vivo* o óleo essencial de *M. citrifolia* foi efetivo no controle das doenças foliares na cultura do milho inibindo a severidade de doenças como a mancha de *Bipolaris* e mancha de *Exserohilum* causadas pelos fitopatógenos *Bipolaris maydis* e *Exserohilum turcicum*.

Além da atividade fungitóxica direta nos fitopatógenos estudados o óleo essencial de *M. citrifolia* apresentou potencial como substância elicitadora na síntese de fitoalexinas como deoxiantocianidinas e gliceolinas e enzimas antioxidativas envolvidas nos mecanismos de defesa vegetal.