



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

PEDRO RAYMUNDO ARGÜELLES OSORIO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E
CONTROLE ALTERNATIVO DA FERRUGEM DA TECA
(*Olivea neotectonae*) COM ÓLEOS ESSENCIAIS**

**GURUPI-TO
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

PEDRO RAYMUNDO ARGÜELLES OSORIO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E
CONTROLE ALTERNATIVO DA FERRUGEM DA TECA
(*Olivea neotectonae*) COM ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador:
Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos

**GURUPI-TO
2016**

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

O83c

Osorio, Pedro Raymundo Argüelles

Título: Caracterização morfológica, molecular e controle alternativo da ferrugem da teca (*Olivea neotectonae*) com óleos essenciais. Pedro Raymundo Argüelles Osorio-GURUPI, 2016. 125f.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em produção vegetal, 2016.

Linha de pesquisa: Fitossanidade.

Orientador: Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos.

11. *Olivea neotectonae*. 2. *Tectona grandis*. 3. Agente etiológico da ferrugem. 4. Proteção florestal I. Santos, Gil Rodrigues II. Universidade Federal do Tocantins. III. 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
Câmpus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal

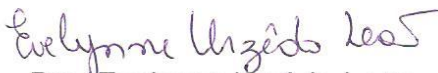
Defesa nº

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE PEDRO RAYMUNDO ARGÜELLES
OSORIO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**

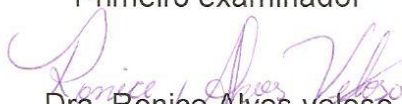
Aos 29 dias do mês de Julho do ano de 2016, às 14:00 horas, na Sala de 15 do Bloco Bala II, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Gil Rodrigues dos Santos do Campus Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, Dra. Evelynne Urzêdo Leão do Campus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins, Dra. Ronice Alves Veloso sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de PEDRO RAYMUNDO ARGÜELLES OSORIO, intitulada "**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E CONTROLE ALTERNATIVO DA FERRUGEM DA TECA (*Olivea neotectonae*) COM ÓLEOS ESSENCIAIS**". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, habilitando-o ao título de Mestre em Produção Vegetal.

favorável à aprovação, habilitando-o ao título de Mestre em Produção Vegetal.

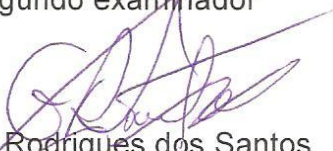
Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



Dra. Evelynne Urzêdo Leão
Primeiro examinador

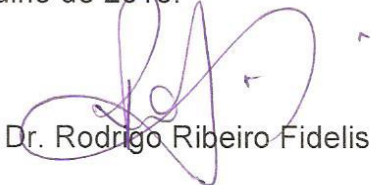


Dra. Ronice Alves Veloso
Segundo examinador



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

Gurupi, 29 de julho de 2016.



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

DEDICO

A meus pais Marbella Osorio e Normand Alfonso, por todo o carinho, dedicação e força inesgotável em todos os momentos que poderiam estar comigo neste caminho longe. Estarei sempre agradecido por todo o sacrifício feito por mim.

A meus irmãos, Ligia Beatriz, Lizbeth Guadalupe e Jesus Alfonso, por suas palavras de ânimo e apoio durante os dois anos de estar longe de vocês.

A minha amada Quezia Martins, pela motivação e força que meu brindo.

A todos meus familiares e amigos que sempre me deram força.

A meus avós queridos, Fernando de Jesus Salas Osorio (*in memoriam*) e María Elena Góngora López (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me abençoado com o dom da vida, iluminando e guiando meus caminhos e pela força de vontade para seguir e nunca desistir de meus sonhos e ideais.

Aos meus pais Marbella Osorio Lopéz e Normand Alfonso Argüelles Pat, que sempre me apoiaram em minha formação acadêmica. Me ensinando que o trabalho duro e a perseverança são ferramentas ideais para atingir nossas metas.

Aos meus irmãos Ligia Beatriz Argüelles Osorio, Lizbeht Guadalupe Argüelles Osorio e Jesus Alfonso Argüelles Osorio pelo carinho e incentivo.

A minha linda Quezia, sempre me incentivando. Obrigado pela paciência, companheirismo e amor.

A meu orientador Dr. Gil Rodrigues dos Santos pela orientação, disponibilidade e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus grandes amigos do laboratório de fitopatologia que me ajudaram na realização desse trabalho, Dra. Ronice Veloso, Dra. Evelynne, Dalmácia de Souza, Jaiza Ribeiro, Matheus Dalcin, Jonathan Fontes, João Vinicius, Micaele Souza, Rosangela Sousa, Patrícia Resplandes, Vanilza, muito obrigado pela ajuda,

apoio na realização dos experimentos e pela convivência permitindo que me sentisse em casa.

Aos demais membros da minha família: Avós, Tios (as), Primos (as) e Sobrinho(a), agradeço seu apoio e pelos incentivos.

A todos aqui não mencionados que, de certa forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao CONACYT pelo auxílio financeiro concedido à realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Tocantins/Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização da dissertação.

Enfim, a todos aqueles que torceram por mim e de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão deste trabalho, um muito obrigado!

RESUMO GERAL

A área cultivada com teca (*Tectona grandis* L. f) tem aumentado no Brasil e também nos últimos anos no estado do Tocantins. Entretanto, as pesquisas relacionadas aos problemas fitossanitários da espécie ainda não foram desenvolvidas, especialmente para o fungo *Olivea neotectonae*, agente causal da ferrugem da teca, uma das doenças fúngicas de maior importância econômica nesta espécie florestal. Diante deste fato, o trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos: No capítulo I, foi realizado a caracterização morfológica e molecular de *O. neotectonae*, agente causal da ferrugem da teca. Para tal, folhas de teca apresentando pústulas amarelas e pulverulentas na face abaxial, característicos da ferrugem da teca, foram coletadas nos municípios de Gurupi e Lagoa da Confusão, no estado do Tocantins. Na observação em microscópio ótico, foram visualizadas e medidas as estruturas fúngicas. Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar as estruturas do patógeno e o modo de penetração através dos estômatos. A amplificação por PCR da região ITS do rDNA de *O. neotectonae* utilizando os pares de iniciadores

ITS1-ITS4 foi bem sucedida, obtendo um fragmento de 600 pb. O sequenciamento direto do produto do PCR da região ITS de *O. neotectonae*, sugeriu se tratar de uma espécie pertencente à família Chaconiaceae. Com base nestes resultados e das características morfológicas observadas, foi possível confirmar *O. neotectonae* como sendo o agente causal da ferrugem da teca. No capítulo II, em razão da ausência de fungicidas registrados para o controle desta doença em plantas de teca e a busca por métodos alternativos de controle de doenças que não sejam prejudiciais ao meio ambiente, objetivou avaliar o efeito dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* L.), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) e noni (*Morinda citrifolia* L.) na germinação de urediniósporos de *O. neotectonae*; avaliar o efeito fitotóxico destes óleos essenciais sob as mudas de teca; e avaliar o uso dos óleos essenciais no controle da ferrugem da teca quando aplicados de forma preventiva e curativa. Verificou-se que os óleos essenciais de noni e capim-limão inibiram 100% da germinação dos urediniósporos. Porém, quando aplicados nas mudas em doses mais elevadas, os óleos essenciais de noni e capim-limão causaram fitotoxidez às plantas. Foram

identificados os constituintes químicos majoritários no óleo essencial de folhas de capim-limão o geranial (41,46%) e neral (32,43%), no capim-citronela o citronelal (30,07%), no matruz o α -terpinol (41,97%), e no óleo essencial extraído a partir de frutos de noni maduros foi o ácido octanóico (64,03%). O controle preventivo foi mais eficaz no controle da ferrugem do que a aplicação curativa, tanto para o óleo de capim-limão quanto para o noni. Quando se comparou os dois óleos no controle curativo foram encontrados menores valores da área abaixo da curva de progresso da ferrugem quando se utilizou o óleo essencial de capim-limão.

Palavras-chave: *Olivea neotectonae*, *Tectona grandis*, agente etiológico da ferrugem, proteção florestal.

GENERAL ABSTRACT

The area planted with teak (*Tectona grandis* L.f) has increased in Brazil and in recent years in the state of Tocantins. However, research related to phytosanitary problems of the species have not yet been developed, especially for the fungus *Olivea neotectonae* causal agent of rust teak, one of the fungal diseases of major economic importance in this forest species. Given this fact, the work was developed with the following objectives: In Chapter I, the morphological and molecular characterization of *O. neotectonae*, causal agent of teak rust was conducted. To this end, teak sheets featuring yellow and powdery pustules on the abaxial surface, characteristic of the teak rust were collected in the municipalities of Gurupi and Lagoa da Confusão in the state of Tocantins. In the observation by an optical microscope, they were viewed and measured fungal structures by scanning electron microscopy was observed pathogen structures and the penetration mode through the stomata. PCR amplification of the ITS region of rDNA *O. neotectonae* using pairs of primers ITS1-ITS4 was successful, obtaining a 600 bp fragment. Direct sequencing of the PCR product from ITS

O. neotectonae region, suggested it is a species belonging to the family Chaconiaceae. Based on these results and of morphology observed was confirmed *O. neotectonae* as the causal agent of teak rust. In Chapter II, due to the absence of fungicides registered for the control of this disease in teak and the search for alternative methods of disease control that are not harmful to the environment, to evaluate the effect of the essential oils of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* L.), matrutz (*Chenopodium ambrosioides* L.) and noni (*Morinda citrifolia* L.) on germination urediniospores *O. neotectonae*; assess the phytotoxic effect of these essential oils in teak seedlings; and evaluate the use of essential oils in control of the teak rust when applied preventive and curative manner. It was found that essential oils of noni and lemongrass inhibited 100% germination of urediniospores. However, when applied to plants at higher doses, the essential noni and lemongrass oils phytotoxicity caused plants. The majority chemical constituents were identified in the essential oil of lemongrass leaves the geranial (41.46%) and neral (32.43%), the grass citronella citronellal (30.07%) in matrutz the α -terpineol (41.97%) and essential oil

extracted from mature noni fruit was octanoic acid (64.03%). The preventive control was more effective in controlling the disease than curative application, both for lemongrass oil as for noni. When comparing the two oils in the curative control were found lower values of the Area Under the Rust Progress Curve when using the essential oil of lemongrass.

Keywords: *Olivea tectonae*, teak, etiological agent of rust, forest protection.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	9
GENERAL ABSTRACT.....	12
LISTA DE TABELAS.....	17
Capítulo II.....	17
LISTA DE FIGURAS.....	18
Capitulo I.....	18
Capítulo II.....	19
INTRODUÇÃO GERAL.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO I.....	33
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Olivea neotectonae</i> , AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DA TECA.....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÕES.....	58
AGRADECIMENTOS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

CAPÍTULO II	65
ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE ALTERNATIVO DA FERRUGEM DA TECA.....	65
RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	68
INTRODUÇÃO	70
MATERIAL E MÉTODOS	73
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
AGRADECIMENTOS.....	100
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1. Constituintes químicos dos óleos essenciais de capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i> L.), noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.), citronela (<i>Cymbopogon citratus</i> L.) e mastruz (<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.) identificados por CG/EM e seus respectivos teores expressos em percentagem. Gurupi-TO, 2016.....	89
---	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Ferrugem (*Olivea neotectonae*) incidente na cultura de teca (*Tectona grandis* L.) **A.** Sintomas nas folhas; **B.** Pústulas com intensa esporulação, **ME.** Massa de esporos na epiderme da folha, **UR.** Urédias; **C.** Urediniósporos; **E.** Germinação do urediniósporos, **TG.** Detalhe do tubo germinativo, **AP.** Detalhe do apressório; **D.** Urediniósporos apresentando poros germinativos, **PG.** Detalhe dos poros germinativos. 48

Figura 2. Electromicrografias de varreduras de folhas de teca infectadas com *Olivea neotectonae*. (A) folha infectada com ferrugem; (B) urediniósporo; (C) pústulas de *O. neotectonae* esporulando; (D) Paráfises curvadas e hialinas **P**; (E) Urediniosporos germinando, apresentando tubo germinativo **TG**; (F) Urediniósporos apresentando apressório **AP**; (G) penetração do patógeno através do ostíolo do estômato..... 51

Figura 3. Electroforese em gel de agarose 0.8% dos produtos de amplificação da região ITS do rDNA de *Olivea neotectonae* utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4. Faixas: M: Marcador de peso molecular de 1Kb (1000 bp); 1-2: Amostras; C-: Controle negativo. 53

Figura 4. Árvore Filogenética de *Olivea neotectonae*, gerada a partir do sequenciamento da região ITS do rDNA, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2- parâmetros e teste de bootstrap com 2000 replicatas. 55

Capítulo II

Figura 1. Porcentagem de germinação de urediniósporos de *Olivea neotectonae* submetidos a diferentes concentrações dos óleos essenciais (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 E 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de noni (*Morinda citrifolia* L.), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.) e citronela (*Cymbopogon nardus* L.)..... 84

Figura 2. Percentagem de área foliar afetada pela fitotoxicidade de diferentes concentrações (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.) e noni (*Morinda citrifolia* L.) em plantas de teca. 86

Figura 3. Área da Curva de Progresso da Doença (AACPD) da ferrugem da teca sob diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.) (0,25, 0,50, 0,75, 1, 1,25, 1,5, e 1,75 $\mu\text{L mL}^{-1}$)..... 93

Figura 4. Área da Curva de Progresso da Doença (AACPD) da ferrugem da teca sob diferentes concentrações do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia* L.) (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$)..... 94

INTRODUÇÃO GERAL

A teca (*Tectona grandis* L.f) é uma das espécies florestais mais cultivadas no mundo na qual seu principal produto é a madeira, muito valorizada e procurada a nível mundial devido à alta qualidade e resistência para construção naval e para a fabricação de móveis finos (FIGUEIREDO et al., 2005). O Brasil tem um grande potencial competitivo na produção de teca, sendo o estado de Mato Grosso o maior produtor, seguido pelos estados de Pará e Roraima (ABRAF, 2013).

Como toda espécie vegetal, a teca apresenta problemas fitossanitários. Um dos principais problemas enfrentados pelos produtores são as doenças causadas por fungos. Entre as doenças que acomete esta espécie, destaca-se a ferrugem, causada pelo fitopatógeno *Olivea neotectonae* (= *Chaconia tectonae* T.S. & K. Ramark). Os sintomas iniciam na superfície abaxial da folha, causando manchas cloróticas que progridem rapidamente para lesões, que podem levar a necroses até queima generalizada nas folhas, e conseqüentemente, a desfolha da planta. Pode-se observar urédias pulverulentas de coloração amarela laranja devido à formação intensiva de

urediniósporos (ARGUEDAS, 2004; BONALDO et al., 2011).

Quando em condições de elevada humidade e temperatura, condições ideais para o desenvolvimento do patógeno, a doença causa desfolha intensa na planta, e conseqüentemente, afeta a fotossíntese, ocasionando redução na produção. *Olivea neotectonae* tem gerado grandes preocupações no setor florestal brasileiro devido à pouca informação sobre a identificação do patógeno, e por não haver fungicidas registrados no Brasil para o controle (ARGUEDAS, 2004).

O patógeno foi descoberto pela primeira vez na Ásia e estava restrita somente a essa região, no entanto o patógeno foi constatado em vários outros países (PIERI et al., 2011). No continente americano, em novembro de 2003, ocorreu o primeiro relato no Panamá, seguido por Costa Rica em janeiro de 2004 (ARGUEDAS, 2004), setembro no Equador (BELEZACA, 2004) e em dezembro foi detectado no México (NAPPO, 2004). No ano de 2005 foi registrado na Colômbia (CÉSPEDES e YEPES, 2007) e em Cuba no mês de novembro de 2006 (PÉREZ et al., 2008). Na Austrália, foi relatado em junho de 2006 (DALY et al., 2006). No Brasil, há relatos da doença nos estados

de São Paulo (PIERI et al., 2011), Mato Grosso, Maranhão (FERRARI, 2009; BONALDO et al., 2011), Amazonas (GASPAROTTO e PEREIRA, 2014) e Goiás (MARQUES et al., 2015).

No estudo do patógeno, a identificação correta e a descrição minuciosa são fundamentais para reconhecimento do agente causal da doença e para o estabelecimento de estratégias para seu controle. A identificação dos fungos é baseada principalmente em observações de características morfológicas, fisiológicas e taxonômicas, via microscopia de luz e eletrônica, e a utilização por meio de chaves apropriadas (CASTRO, 2012; MAY-DE MIO et al., 2006; BURGESS et al., 1995). Lima et al. (2004) identificaram por meio do estudo de estruturas fúngicas ao microscópio estereoscópico e ótico e por caracterização com micrografias cinco espécies de fungos causadores de ferrugens da família Pucciniaceae. Castro (2012), descreveu por análises taxonômicas e análises de microscopia eletrônica de varredura 29 fungos, uma nova espécie e oito novos relatos de fungos em plantas hospedeiras inéditas. Conforme descrito por May-De Mio et al. (2006), imagens de paráfises, urediniósporos, teliósporos e outras estruturas são de

grande importância para a correta taxonomia desta ordem de fungos.

No entanto, apenas a caracterização morfológica não permite uma identificação confiável, a nível de espécie para a maioria dos gêneros fúngicos (FUNGARO, 2000). Sendo o uso de técnicas moleculares essenciais para complementar à identificação e caracterização no estudo destes patógenos. Nas últimas décadas, verificou-se um aumento significativo no uso de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de fungos por meio de estudos do DNA ribossomal (rDNA). Essa região genômica consiste em uma série repetitiva de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS e IGS). Estas regiões intergênicas acumulam muitas mutações durante o processo de evolução do organismo, podendo assim, ser útil para a diferenciação entre espécies e até mesmo para filogenia ao nível intraespecífico (FUNGARO, 2000). O fato das regiões ITS serem relativamente pequenas (500 a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permitem que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (SKOUBOE et al., 1999; LEAL-JUNIOR, 2002).

As ferramentas moleculares irão exercer um papel importante principalmente em estudos filogenéticos de espécies dentro do gênero *Olivea*, visto que até o momento não existem sequências disponíveis da espécie *O. neotectonae*.

Uma das principais estratégias do controle de doenças e pragas é a utilização de produtos químicos. O uso indiscriminado de fungicidas tem provocado danos ao meio ambiente, aos seres vivos e tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos aos ingredientes ativos dos produtos químicos (GHINI e KIMATI, 2000). O uso de métodos alternativos tem merecido destaque no cenário científico, com o desenvolvimento de diversas pesquisas na busca de alternativas que possam ser empregadas para o controle sobre fitopatógenos, e que não sejam danosos ao meio ambiente.

Visando a utilização de produtos naturais com o objetivo de reduzir o impacto causado pelos agrotóxicos, se encontram a utilização de extratos vegetais, hidrolatos e óleos essenciais de plantas medicinais, aromáticas e condimentares (PEREIRA et al., 2006; DHIMA et al., 2010). Principalmente, os óleos essenciais de plantas

medicinais (MUTHAIYAN et al., 2012), originários do metabolismo secundário são formados por constituintes químicos complexos, destacando-se os de baixo peso molecular, como os monoterpenos e sesquiterpenos (CRAVEIRO, 1993; CASTRO et al., 2007; BIZZO, 2009). Entretanto, são poucos os trabalhos que relatam o uso de óleos essenciais no controle de doenças em espécies florestais, como no caso da ferrugem da teca. Salustiano et al., (2006) avaliando a atividade de extratos de folhas e de óleo essencial de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) sobre a germinação de urediniósporos de *Puccinia psidii*, *Hemileia vastatrix*, *Phakopsora pachyrhizi*, e *Cerotelium fici* e sobre o crescimento micelial de *Cylindrocladium scoparium*, observaram que os urediniósporos de todas as ferrugens não germinaram quando submetidas aos tratamentos, exceto no tratamento testemunha. Os autores relataram ainda que os tratamentos com o chá à 10% e óleo essencial à 1% reduziram 25% o crescimento micelial e 28 a 34% da produção de esporos, respectivamente.

Diante do exposto, este trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro, intitulado “Caracterização morfológica e molecular de *Olivea*

neotectonae, agente causal da ferrugem da teca” com o objetivo de caracterizar o agente causal da ferrugem da teca através de microscopia de luz e eletrônica e o sequenciamento da região ITS de *O. neotectonae*. O segundo capítulo, intitulado “Óleos essenciais no controle alternativo da ferrugem da teca” objetivou avaliar o efeito dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.), capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) e noni (*Morinda citrifolia* L.) na germinação de urediníósporos de *Olivea neotectonae*, agente causal da ferrugem da teca (*Tectona grandis*); avaliar o efeito fitotóxico destes óleos essenciais em mudas de teca, bem como avaliar o uso dos óleos essenciais no controle da ferrugem em plantas de teca quando aplicados de forma preventiva e curativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. *Anuário estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012*. Brasília: ABRAF, 2013. 148 p.

ARGUEDAS, M. La roya de La teça *Olivea tectonae* (Rac.): consideraciones sobre su presencia em Panamá y Costa Rica. **Revista Forestal Kurú**, Costa Rica v.1, n.1, p.1-16, 2004. (Nota Técnica).

BELEZACA, C. La roya de la teca (*Tectona grandis* L.f.) presente en la zona central del litoral ecuatoriano, 2004. Disponível em: [<http://www.uteq.edu.ec/produccion/madera/general.htm>], Acesso em: 12 dez. 2015.

BIZZO, R. H. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p.588-594, 2009.

BONALDO, S. M.; BARCELI, A. C.; TRENTO R. A.; GASPAROTTO, F.; TAFFAREL C. Relato oficial da ocorrência de *Olivea tectonea* em teca (*Tectona grandis*) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.3, p.153, 2011.

BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, Edinburg, v.99, n.1, p.1-13, 1995.

CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; LEAL, T. C. A. B.; SOUZA, C. M.; NAZARENO, A. C. Crescimento, teor e

composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.4, p.55-61, 2007.

CASTRO, M. T. D. (2012). **Pucciniales em plantas nativas do Cerrado brasileiro e em algumas exóticas**, 2012. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CÉSPEDES, P. B.; YEPES, M. S. Nuevos registros de royas (uredinales) potencialmente importantes en Colombia. **Revista Facultad Naltional de Agronomia**, Medellín, v.60, n.1, p.3645-3655, 2007.

CRAVEIRO, A. A.; DAILO, C. Q. Óleos essências e química fina. **Química nova**, v.16, n.3, p. 224-228, 1993.

DALY, A. M.; SHIVAS, R. G.; PEG, G. S.; MACKIE, A. E. First record of teak leaf rust (*Olivea tectonae*) in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, Australia, v.1, n.1, p.25–6, 2006.

DHIMA, K.; VASILAKOGLU, I.; GARANE, V.; RITZOULIS, C.; LIANOPOULOU, V.; PANOU-PHILOTHEOU, E. Competitiveness and essential oil phytotoxicity of seven annual aromatic plants. **Weed Science**, v.58, n.4, p.457–465, 2010.

FERRARI, J. T. **Ocorrência de ferrugem (*Olivea tectonae*) em plantas de teca no Brasil**. O *Biológico*, São Paulo, v.71, n.2, p.165, 2009. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 22, São Paulo, SP (resumo 166).

FIGUEIREDO, E. O.; OLIVEIRA, A. D. de; SCOLFORO, J. R. S. Análise economia de povoamentos não desbastados de *Tectona grandis* L.f., na microrregião do Baixo Rio Acre. **Cerne**, Lavras, v.11, n.4, p.342-353, 2005.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v.3, n.14, p.12-16. 2000.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. **A Ferrugem da Teca no Estado do Amazonas**. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, p.4, 2014. (Comunicado Técnico 101).

GHINI, R. e KIMATI, H. **Resistência de Fungos a Fungicidas. Jaguariúna**. Embrapa Meio Ambiente. 2000.

LEAL JUNIOR, G. A. 2002. **Diagnóstico de *Crinipellis perniciosa*, em tecidos de *Theobroma cacao* e caracterização molecular e sorológica de isolados coletados de vários hospedeiros**. Dissertação Mestrado. Universidade de São Paulo. Piracicaba Brasil. 2002.

LIMA, C. S.; SOUZA, P. E. D.; e BOTELHO, A. O. Fungos da família Pucciniaceae causadores de ferrugem em plantas medicinais. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.5, p. 499-503, 2004.

MARQUES, M. L. S., JESUS, J. M. I., VIRTUOSO, M. C. S., MARQUES, V. S., e SANTOS, G. R. Relato de ocorrência da ferrugem da teca, causada por *olivea neotectonae* no estado de Goiás. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, Pombal - PB – Brasil, v.10, n.5, p.21-25, 2015.

MAY DE MIO, L. L.; NOVAES, Q.; e ALVES, E. Metodologias de preparação de amostras de ferrugem para estudos morfológicos de urediniósporos por meio de microscopia eletrônica de varredura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu v.32, n.3, p.267-273, 2006.

MUTHAIYAN, A.; BISWAS, D.; CRANDALL, P. G.; WILKINSON, B. J. e RICKE, S. C. Application of orange essential oil as an antistaphylococcal agent in a dressing model. *BMC complementary and alternative medicine*, v.12, n.1, p.1-8, 2012.

NAPPO Pest Alert – Official Pest Reports for Mexico. Detección de la Roya de la Teca (*Olivea tectonae*), (Rac.) Thirun. Chaconiaceae, en el municipio de Las Choapas, Veracruz, Mexico – 04/11/2005. México, 2005. Disponível em:
<<http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=142&keyword=Olivea%20tectonae>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

PEREIRA, M. C.; VILELA, R. G.; COSTA, S. A. M. L.; SILVA, F. R.; FERNANDES, F. A.; FONSECA, N. W. E.; PICCOLI, H. R. Inibição do desenvolvimento fúngicos através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, v.30, n.4, p 731-738, 2006.

PÉREZ, M.; LÓPEZ, M. O.; MARTÍ, O. *Olivea tectonae*, leaf rust of teak, occurs in Cuba. **New Diseases Reporter**. Cuba, v.17, 2008.

PIERI, C.; PASSADOR, M. M.; FURTADO, E.L.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Novas observações sobre a ocorrência da ferrugem da teca (*Tectona grandis*) no

Brasil e revisão taxonômica do patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n.4, p.199-201, 2011.

SALUSTIANO, M. E.; FERRAZ FILHO, A. C.; POZZA, E. A.; e DE CASTRO, H. A. Extracts of candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish) in the inhibition *in vitro* of *Cylindrocladium scoparium* and four rust species. **Cerne**, v.12, n.2, p.189-193, 2006.

SKOUBE, P.; FRISVAD, J. C.; TAYLOR, J. W.; LAURITSEN, D.; BOYSEN, M.; ROSSEN, L. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of *Penicillium terveticillate* species. **Mycological Research**, Cambridge v.103, p.873-881, 1999.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Olivea neotectonae*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DA TECA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Olivea neotectonae*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DA TECA

RESUMO

O fungo *Olivea neotectonae* é o agente causal da ferrugem da teca (*Tectona grandis* L.f), uma das doenças fúngicas de maior importância econômica nesta espécie florestal. Neste contexto, sabe-se que o primeiro passo para o manejo eficaz de uma doença é o diagnóstico correto do patógeno. Assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar o agente causal da ferrugem da teca através de microscopia de luz e eletrônica e o sequenciamento da região ITS de *O. neotectonae*. Folhas de teca apresentando pústulas amarelas e pulverulentas na face abaxial, características da ferrugem, foram coletadas nos municípios de Gurupi e Lagoa da Confusão, no estado do Tocantins. A análise de microscopia de luz revelou características semelhantes ao descrito na literatura para esta espécie, sendo os urediniósporos pedicelados, subglobosos, ovóides a elipsóides, com colorações variando do amarelo, amarelo alaranjado e marrom, apresentando diferentes tamanhos. Teliósporos não

foram observados. Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar tecidos da folha de teca infectada com *O. neotectonae*, as estruturas do patógeno e o modo de penetração através dos estômatos. A amplificação por PCR da região ITS do rDNA de *O. neotectonae* utilizando os pares de iniciadores ITS1-ITS4 foi bem-sucedida, obtendo um fragmento de 600 pb. O sequenciamento direto do produto de PCR da região ITS de *O. neotectonae*, sugeriu tratar-se de uma espécie pertencente à família Chaconiaceae, porém sem sequências similares depositadas na base de dados do GenBank. Com base nestes resultados e das características morfológicas observadas, foi possível confirmar *O. neotectonae* como sendo o agente causal da ferrugem da teca.

Palavras-chaves: *Tectona grandis*, microscopia eletrônica, extração de DNA, região ITS, Chaconiaceae.

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF *Olivea neotectonae*, THE
CAUSAL AGENT OF TEAK RUST**

ABSTRACT

The fungus *Olivea neotectonae* is the causal agent of rust teak (*Tectona grandis* L.f), one of the fungal diseases of major economic importance in this forest species. In this context, it is known that the first step for the effective management of a disease is proper diagnosis of the pathogen. The objective of the study was to characterize the causative agent of the teak rust by light and electron microscopy and sequencing of the ITS region of *O. neotectonae*. teak leaves featuring yellow and powdery pustules on the abaxial surface, rust characteristics, were collected in the municipalities of Gurupi and Confusion Lagoon in the state of Tocantins. The analysis light microscopy showed characteristics similar to those described in the literature for this species, and the pedunculate urediniospores, subglobose, ovoid to ellipsoidal, with varying hues of yellow, orange and brown yellow, presenting different sizes. Teliospores were not observed. By scanning electron microscopy was observed teak leaf tissues infected with *O. neotectonae*, pathogen

structures and the penetration mode through the stomata. PCR amplification of the ITS region of rDNA *O. neotectonae* using pairs of primers ITS1-ITS4 was successful, obtaining a 600 bp fragment. Direct sequencing of the PCR product from ITS *O. neotectonae* region, suggested it was a species of the Chaconiaceae family, but no similar sequences deposited in GenBank database. Based on these results and of morphology observed was confirmed *O. neotectonae* as the causal agent of teak rust.

Keywords: Teak, electron microscopy, DNA extraction, ITS region, Chaconiaceae.

INTRODUÇÃO

A teca (*Tectona grandis* L. f) é uma espécie florestal exótica, pertencente à família Verbanaceae, originária da Índia e Indonésia, cultivada principalmente para produção de madeira (FIGUEIREDO et al., 2005). A espécie foi introduzida no Brasil no final da década de 60 no estado de Mato Grosso, onde foram estabelecidos os primeiros plantios em escala comercial (CALDEIRA; OLIVEIRA, 2008; SANTOS et al., 2010). Atualmente, o plantio de teca encontra-se consolidado no país, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Norte, com grande potencial de consumo e de exportação.

As perdas anuais de produção por problemas fitossanitários estão estimadas em cerca de 15 a 20%, entretanto, algumas doenças podem causar prejuízos de quase de 100% (ALMEIDA et al., 2005). Entre as doenças de importância econômica destaca-se a ferrugem, causada por *Olivea neotectonae* (= *Chaconia tectonae* T.S. & K. Ramark) (Família Chaconiaceae) detectado em todas as fases fenológicas da planta.

O patógeno foi descoberto pela primeira vez na Ásia e estava limitado apenas a essa região, mais a

doença rapidamente disseminou-se para outros países como, Panamá, Costa Rica (ARGUEDAS, 2004), Equador (BELEZACA, 2004), México (NAPPO, 2004), Colômbia (CÉSPEDES e YEPEZ, 2007), Cuba (PÉREZ et al., 2008), e Austrália (DALY et al., 2006). No Brasil, verificou-se inicialmente a presença de sintomas de ferrugem e sinais do patógeno em mudas e plantas adultas no estado do Mato Grosso (BONALDO et al., 2011). Atualmente, há relatos da presença do patógeno em diversos estados, como Maranhão, São Paulo (PIERI et al., 2011), Amazonas, Tocantins (GASPAROTTO e PEREIRA, 2014) e Goiás (MARQUES et al., 2015).

Os patógenos responsáveis pelas ferrugens como *O. neotectonae*, são fungos basidiomicetos pertencentes a ordem Uredinales. A classificação destes fungos, entretanto, é ainda um problema devido à morfologia complexa e semelhante entre espécies, ciclo de vida e diferentes hospedeiros. Além disso, a maioria destes organismos atuam como parasitas obrigatórios e não apresentam fase saprófita em seu ciclo vital (ALEXOPOULOS et al., 1996; KIMATI et al., 2005).

Estudos de diversidade e taxonomia de fungos, são tradicionalmente baseados em observações de

caracteres morfológicos e taxonômicos, via microscopia de luz e eletrônica, e à identificação por chaves apropriadas (CASTRO, 2012; MAY-DE MIO et al., 2006; BURGESS et al., 1995). No entanto, apenas com este recurso, não é possível realizar a identificação confiável a nível de espécie para a maioria dos gêneros fúngicos (FUNGARO, 2000). Assim, o uso de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização destes patógenos torna-se essencial para dar maior consistência e confiabilidade à classificação tradicional.

A correta identificação do patógeno consiste no primeiro passo em direção ao manejo adequado da doença por ele causada. De acordo com a literatura consultada, o presente estudo é o primeiro a se concentrar na caracterização molecular de *O. neotectonae*. A identificação molecular do patógeno poderá possibilitar a sua identificação imediata em diversas localidades, utilizando apenas os urediniosporos coletados. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho caracterizar o agente causal da ferrugem da teca através de microscopia de luz e eletrônica e o sequenciamento da região ITS de *O. neotectonae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização morfológica

Entre julho 2015 e março de 2016, foram coletadas folhas de teca apresentando pústulas amarelas e pulverulentas na face abaxial, característicos da ferrugem, nos municípios de Gurupi e Lagoa da Confusão, no estado do Tocantins. Em seguida, as folhas foram levadas ao laboratório, observadas as lesões típicas de ferrugem, e posteriormente, foram removidos os urediniósporos com o auxílio de um pincel de cerdas macias.

Foram preparadas lâminas para observação das estruturas de 30 urediniósporos de diferentes amostras, de cada localidade, determinando a forma, a coloração e o seu tamanho, com o auxílio de microscópio ótico acoplado a uma câmera e projetadas utilizando software TSVIEW7. Os urediniósporos foram armazenados em frascos de vidro, devidamente identificados e guardados em geladeira até o uso nas demais análises.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram coletadas cinco folhas de teca com diferentes graus de severidade de ferrugem, cortadas em

pequenos fragmentos (0,5 x 0,5 cm), os quais foram imersos em 2 mL de solução de fixador Karnovsky (pH 7,2) e armazenadas durante 24 horas em geladeira. Após este período de fixação, o material foi transferido para novos frascos contendo 2 mL de tampão cacodilato de sódio e armazenados em geladeira. Posteriormente, as amostras foram transferidas a uma solução de tetróxido de ósmio à 1% + ferrocianeto à proporção de 1:1 por 1 hora. Em seguida, foram desidratadas através de lavagem em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70 e 90%) durante 15 minutos uma vez cada uma, e à 100% por 10 minutos três vezes.

Após a desidratação, as amostras de fragmentos foliares foram submetidas à secagem com CO₂ em aparelho de ponto crítico, modelo CPD-030-Balzers. Posteriormente, as amostras foram montadas em *stubs* com uma dupla fita de carbono e levadas ao metalizador (SDC 050 Balzers), onde receberam um banho de ouro por três minutos e em seguida, submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV), modelo JEOL JSM-7001F. As imagens foram obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredora do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Extração do DNA, amplificação e sequenciamento da região ITS

A extração de DNA genômico de *O. neotectonae* foi realizada segundo metodologia adaptada de Alessio et al. (2013). Para cada amostra, 50 mg de urediniósporos foram suspensos em 200 µL de tampão de extração CTAB (2% p/v de CTAB; 2,5% p/v de PVP; 2 M de NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA, pH 8,0) em microtubos de 2 mL, contendo sete esferas de sílica gel, de aproximadamente 3 mm de diâmetro hidratadas e esterilizadas. Os tubos foram agitados em vórtex durante 5 minutos, para quebra mecânica dos urediniosporos, e em seguida, recuperou-se 200 µL da suspensão, as quais foram adicionado 400 µL de tampão de extração contendo 5 µL de proteinase K (10 mg mL⁻¹).

Os tubos foram colocados em banho-maria à 65°C por 2 horas e agitados em vórtex com intervalos de 20 minutos. Na sequência, aos tubos foram adicionados 700 µL de solução de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) e invertidos por 5 minutos. Prosseguiu-se com centrifugação por 20 minutos a 15.000 g à temperatura de 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos tubos, aos quais se adicionaram 500 µL de

isopropanol gelado (-20°C) seguido por leves inversões durante 3 minutos. Os tubos permaneceram em geladeira à -20°C por 40 minutos e foram novamente centrifugados à 15.000 g. Os pellets formados foram lavados duas vezes com etanol 70%, e secos à temperatura ambiente por 15 minutos, sendo posteriormente suspensos em 50 µL de água ultra pura e 1µL de RNase. A extração foi finalizada com incubação à 37°C por uma hora, e em seguida, estocados à -20°C.

As regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de *O. neotectonae* foram amplificadas utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). Na reação de amplificação das amostras, foram utilizados 12,5 µL de Taq DNA Polymerase Master Mix Ampliqon III (Ampliqon ApS, Copenhagen, Denmark), 0,25 µL de cada oligonucleotídeos iniciador ITS1 e ITS4, 3 µL de DNA das amostras e 9 µL de água ultra-pura para completar o volume da reação de 25µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador (Techne TC-5000) programado para desnaturação inicial à 95°C por 2 minutos, seguido de 38 ciclos de 95°C por 30 segundos, anelamento à 51°C por 1 minuto, extensão à 72°C por 1

minuto, e extensão final à 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, 6 µl dos produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 0,8% (TBE 1x) corado com Neotaq Brilliant Green Plus DNA Stain (Neobio, Brasil), observada através de um fotodocumentador (Gel Logic 112). A concentração do DNA foi mensurada em espectrofotômetro (Biowave DNA) à 260 e 280 nm.

Os produtos de amplificação correspondentes à região ITS do rDNA das amostras de *O. neotectonae* foram purificados utilizando-se o Kit de Purificação Purelink® (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acordo com as recomendações do fabricante e submetidos ao sequenciamento direto utilizando o iniciador ITS1.

Após obtidas as sequências, estas foram editadas através do software BioEdit (versão 7.1), em seguida, foram indentificadas sequências similares usando a ferramenta BLASTn do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Após o alinhamento, estas sequências foram processadas no Software MEGA (versão 5.0) (TAMURA et al. 2011), para que fosse elaborada a árvore filogenética dos isolados de *O. neotectonae*, utilizando o método de Máxima

Verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros com 2000 replicações de bootstrap.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica

As folhas coletadas foram analisadas sob lupa estereoscópica, na qual verificou-se a presença de sintomas de ferrugem (Figura 1A), bem como, a presença do patógeno (Figura 1B). Os sintomas observados nas folhas foram visualizados na parte adaxial, como pequenos pontos inicialmente cloróticos e posteriormente tornando-se lesões necróticas escuras, e na parte abaxial observou-se massas de esporos (Figura 1B) de coloração amarelo laranja com intensa esporulação, e pústulas (urédias) de coloração preta (Figura 1B).

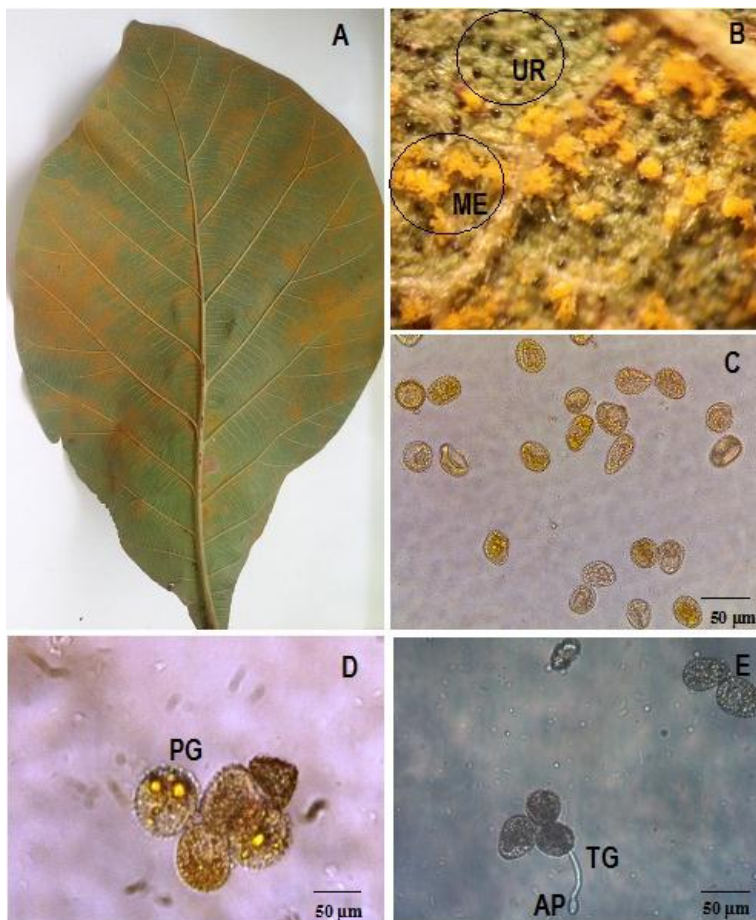


Figura 1. Ferrugem (*Olivea neotectonae*) incidente na cultura de teca (*Tectona grandis* L.) **A.** Sintomas nas folhas; **B.** Pústulas com intensa esporulação, **ME.** Massa de esporos na epiderme da folha, **UR.** Urédias; **C.** Urediniósporos; **E.** Germinação do urediniósporos, **TG.** Detalhe do tubo germinativo, **AP.** Detalhe do apressório; **D.** Urediniósporos apresentando poros germinativos, **PG.** Detalhe dos poros germinativos.

A análise de microscopia de luz revelou urediniósporos pedicelados, subglobosos, ovóides a elipsóides, com colorações variando do amarelo, amarelo alaranjado e marrom, com tamanho variando de 16,52 a 25,11 x 12,08 a 23,01 μm (Figura 1C). Paráfises densas e marginais; paráfises cilíndricas, encurvadas foram observadas. Tubos germinativos apresentando tamanho médio de 26,37 x 2,97 μm (Figura 1D), apressórios com tamanho médio de 6,76 x 3,27 μm (Figura 1D), e esporos germinativos (Figura 1E). Teliósporos não foram observados. As características morfológicas observadas foram confirmadas para os urediniosporos coletados em ambos os locais, semelhante ao descrito na literatura para *O. neotectonae* (BONALDO et al., 2011; FERRARI, 2009; MARQUES et al., 2015; PIERI et al., 2011; GASPAROTTO e PEREIRA, 2014).

A alteração do nome do patógeno proposta por Pieri et al. (2011) de *O. tectonae* para *O. neotectonae* baseia-se no fato de que este fungo não apresenta espermogônios e nem écios conhecidos, e télios não foram encontrados no Brasil.

Pelos estudos realizados em microscopia eletrônica de varredura foi possível observar algumas

características da folha de teca infectada com *O. neotectonae*, bem como observar as estruturas do patógeno e o modo de penetração na folha (Figura 2). Na Figura 2 A, nota-se a superfície da folha de teca infectada com *O. neotectonae* demonstrando os urediniósporos entre os tricomas, e na Figura 2 C as pústulas de *O. neotectonae* esporulando na superfície da folha. Na Figura 2 B, observa-se a ultraestrutura dos urediniósporos de *O. neotectonae*. E na Figura 2 D as paráfises curvadas e hialinas dos urediniósporos. Esporos germinados sobre a superfície foliar de teca podem ser observados na Figura 2 E e urediniósporos apresentando apressório na Figura 2 F. Na Figura 2 G encontrou-se um urediniósporo penetrando na folha via complexo estomático (ostíolo).

A microscopia eletrônica de varredura é uma importante ferramenta para o estudo de caracteres morfológicos e taxonômicos de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos, além de possibilitar a visualização das modificações estruturais que ocorrem no patógeno, em decorrência aos diferentes eventos que podem ser encontrados quando se têm a interação planta-patógeno (MAY-DE MIO et al., 2006).

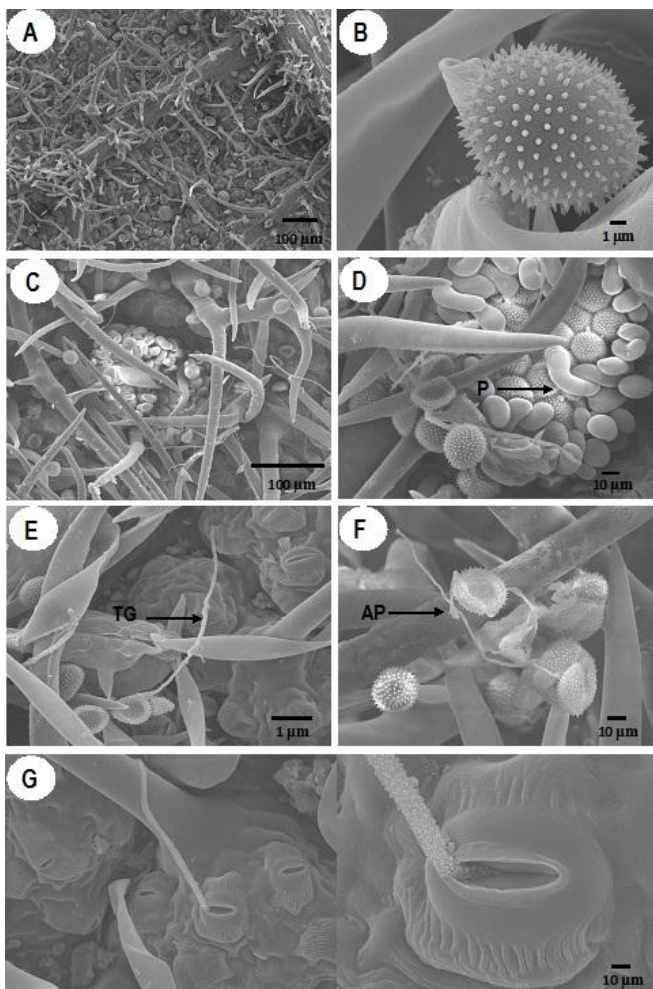


Figura 2. Electromicrografias de varreduras de folhas de teca infectadas com *Olivea neotectonae*. (A) folha infectada com ferrugem; (B) urediniósporo; (C) pústulas de *O. neotectonae* esporulando; (D) Paráfises curvadas e hialinas **P**; (E) Urediniosporos germinando, apresentando tubo germinativo **TG**; (F) Urediniósporos apresentando apressório **AP**; (G) penetração do patógeno através do ostíolo do estômato.

Alterações nas ornamentações de urediniósporos de diversas espécies causadoras de ferrugem foram observadas por May-De Mio et al. (2006) utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Silva-Sousa, (2008) verificou, em clones suscetíveis e resistentes de *Eucalyptus* sp., diferenças na germinação dos urediniosporos de *P. psidii*, através de estudos utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

Diferentes fungos causadores de ferrugem pertencentes a ordem Pucciniales, coletados de diversas espécies de plantas do cerrado e algumas exóticas foram observadas por Castro, (2012) utilizando MEV.

Caracterização molecular

O isolamento do DNA é pré-requisito fundamental para diversas técnicas de biologia molecular. Diversos métodos de extração de DNA foram testados e apenas a metodologia proposta por Alessio et al. (2013) proporcionou uma quantidade suficiente de DNA a partir de urediniósporos de *O. neotectonae* para a amplificação e sequenciamento direto do produto do PCR. A concentração do DNA variou de 139,9 a 551,7 mg mL⁻¹.

A amplificação por PCR da região ITS do rDNA de *O. neotectonae* utilizando os pares de iniciadores ITS1-ITS4 foi bem sucedida, obtendo um fragmento de 600 pb (Figura 3).

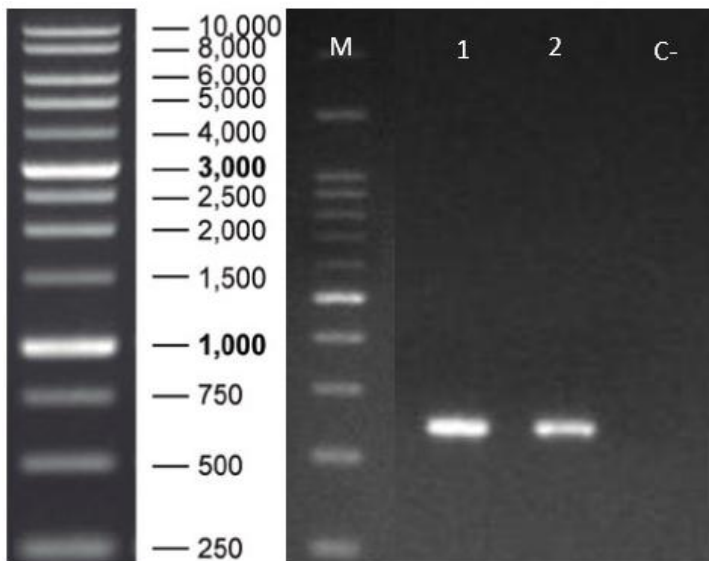


Figura 3. Electroforese em gel de agarose 0.8% dos produtos de amplificação da região ITS do rDNA de *Olivea neotectonae* utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4. Faixas: M: Marcador de peso molecular de 1Kb (1000 bp); 1-2: Amostras; C-: Controle negativo.

Este resultado concorda com os obtidos por outros autores que encontraram fragmentos que variaram em torno de 550 a 700 pb para a região ITS-5.8S-ITS2,

dependendo do iniciador e do isolado fúngico analisado (MENEZES et al., 2010).

A região ITS do rDNA de *O. neotectonae* foi sequenciada e depositada no Genbank (número de acesso KX463504) para melhor caracterização do isolado, fornecendo subsídio para complementar a identificação por análise morfológica. No entanto, ao analisar a sequência obtida, através da busca de sequências similares usando a ferramenta BLASTn do GenBank, constatou-se que até o momento não existem sequências de nucleotídeos depositadas disponíveis da região ITS de *O. neotectonae*, ou de qualquer outra região deste patógeno. Ao observar a similaridade da sequência de nucleotídeos de *O. neotectonae* com às disponíveis no GenBank, constatou-se similaridade em torno de 70% com sequências da região ITS de outros fungos. Demonstrando que a sequência da região ITS do rDNA obtida do isolado de *O. neotectonae*, apesar de não apresentar identidade com nenhuma outra, ainda constitui-se uma sequência de fungo homóloga com as demais já depositadas.

A Figura 4 apresenta a árvore filogenética gerada dos isolados de *O. neotectonae*. Estas foram elaborada

baseando-se nas sequências já geradas da região ITS do rDNA de *O. neotectonae*, juntamente com sequências de nucleotídeos dos patógenos causadores de ferrugens *Puccinia psidii* Winter e *Maravalia pterocarpi* (Thirum.) Thirum., disponíveis no GenBank, sob os números de acesso acesso KP863477 e KU301795, respectivamente.

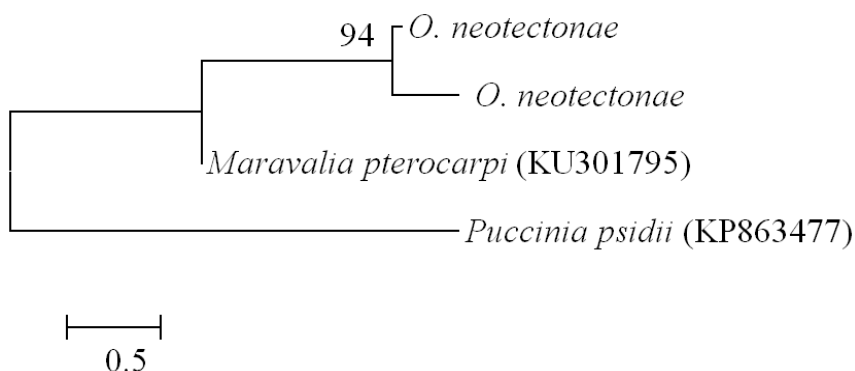


Figura 4. Árvore Filogenética de *Olivea neotectonae*, gerada a partir do sequenciamento da região ITS do rDNA, derivada do método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo evolutivo Kimura-2- parâmetros e teste de bootstrap com 2000 replicatas.

De acordo com a árvore gerada pelo método de máxima verossimilhança, de forma geral, os isolados de

O. neotectonae estão filogeneticamente relacionados a *M. pterocarp*, pertencente a mesma família Chaconiaceae. A *P. psidii* ficou enquadrada em outro ramo filogeneticamente distante, possivelmente por se tratar de uma espécie de família distinta do isolado de *O. neotectonae*.

Os resultados mostraram que a técnica por meio de seqüenciamento direto do produto do PCR da região ITS mostrou-se eficiente para elucidar as características moleculares de *O. neotectonae*, sugerindo se tratar de uma espécie pertencente à família Chaconiaceae, fornecendo subsídio para a confirmação da espécie juntamente com as características morfológicas. Esta ferramenta requer quantidades mínimas de DNA e apresenta alta consistência nos resultados, tornando-se assim um método eficaz para estudo de detecção e identificação de fungos causadores de ferrugens.

A amplificação da região ITS do rDNA tem sido uma ferramenta útil na identificação de espécies de fungos (PORTER e GOLDING, 2011). Por tratar-se de uma região altamente conservada e com alto grau de variabilidade, possibilita a distinção ao nível intra e interespecífico de várias espécies de fungos. Esta região

tem sido proposta como um marcador potencial de “barcode” para fungos (SCHÖCH et al., 2012). Contudo, apesar da região ser amplamente empregada, o sequenciamento de outras regiões adicionais para se chegar a resultados conclusivos são necessárias para a melhor caracterização do patógeno *O. neotectonae*.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados, o agente etiológico da ferrugem da teca é *O. neotectonae*, sendo identificado através das características morfológicas comparadas com o descrito na literatura, e observações de microscopia eletrônica de varredura da estrutura e do modo de penetração do patógeno nas folhas de teca.

As observações morfológicas permitiram caracterizar os urediniósporos como pedicelados, subglobosos, ovóides a elipsóides, com colorações variando do amarelo, amarelo alaranjado e marrom, apresentando diferentes tamanhos.

A caracterização molecular de *O. neotectonae* através do sequenciamento da região ITS do rDNA sugeriu ser uma espécie pertencente à família Chaconiaceae.

AGRADECIMENTOS

Ao Consejo Nacional de Ciencia e Tecnologia (CONACYT) do México pela concedida para a realização deste trabalho.

A Prof. Dr. Sônia Nair Bao do departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, pela concessão de uso do microscópio eletrônico de varredura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSIO, M. V.; HOFFMANN, P. H.; CARNEIRO, S. M. Método rápido para extração de DNA de *Puccinia kuehnii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, n.3, p.198-200, 2013.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; e BLACKWELL, M. **Introductory mycology** (No. Ed. 4). John Wiley and Sons.1996.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, cap. 64, p.569-588, 2005.

ARGUEDAS, M. La roya de La teça *Olivea tectonae* (Rac.): consideraciones sobre su presencia em Panamá y Costa Rica. **Revista Forestal Kurú**, Costa Rica v.1, n.1, p.1-16, 2004. (Nota Técnica).

BELEZACA, C. **La roya de la teca (*Tectona grandis* L.f.) presente en la zona central del litoral ecuatoriano**, 2004. Disponível em: [[http://www.uteq.edu.ec/produccion/madera/ general.htm](http://www.uteq.edu.ec/produccion/madera/general.htm)], Acesso em: 12 dez. 2015.

BONALDO, S. M.; BARCELI, A. C.; TRENTO R. A.; GASPAROTTO, F.; TAFFAREL C. Relato oficial da ocorrência de *Olivea tectonea* em teca (*Tectona grandis*)

no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.3, p.153, 2011.

BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, Edinburg, v.99, n.1, p.1-13, 1995.

CALDEIRA, S. F.; OLIVEIRA, D. L. C. Desbaste seletivo em povoamentos de *Tectona grandis* com diferentes idades. **Acta Amazônica**, Cuiabá, v.38, n.2, p.223-228, 2008.

CASTRO, M. T. D. (2012). **Pucciniales em plantas nativas do Cerrado brasileiro e em algumas exóticas**, 2012. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CÉSPEDES, P. B.; YEPES, M. S. Nuevos registros de royas (uredinales) potencialmente importantes en Colombia. **Revista Facultad Naltional de Agronomia**, Medellín, v.60, n.1, p.3645-3655, 2007.

DALY, A. M.; SHIVAS, R. G.; PEG, G. S.; MACKIE, A. E. First record of teak leaf rust (*Olivea tectonae*) in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, Australia, v.1, n.1, p.25–6, 2006.

FERRARI, J.T. **Ocorrência de ferrugem (*Olivea tectonae*) em plantas de teca no Brasil**. O *Biológico*, São Paulo, v.71, n.2, p.165, 2009. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 22, São Paulo, SP (resumo 166).

FIGUEIREDO, E. O.; OLIVEIRA, A. D. de; SCOLFORO, J. R. S. Análise economia de povoamentos não desbastados de *Tectona grandis* L.f., na microrregião do Baixo Rio Acre. **Cerne**, Lavras, v.11, n.4, p.342-353, 2005.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v.3, n.14, p.12-16. 2000.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C. R. **A Ferrugem da Teca no Estado do Amazonas**. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, p.4, 2014. (Comunicado Técnico 101).

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**, vol. 2, doenças das plantas cultivadas 4º ed. cap. 53, pág 469, São Paulo: Agronômicas Ceres, 2005.

MARQUES, M. L. S.; JESUS, J. M. I.; VIRTUOSO, M. C. S.; MARQUES, V. S.; e SANTOS, G. R. Relato de ocorrência da ferrugem da teca, causada por *Olivea neotectonae* no estado de Goiás. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, Pombal - PB – Brasil, v.10, n.5, p.21-25, 2015.

MAY DE MIO, L. L.; NOVAES, Q.; e ALVES, E. Metodologias de preparação de amostras de ferrugem para estudos morfológicos de urediniósporos por meio de microscopia eletrônica de varredura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu v.32, n.3, p.267-273, 2006.

MENEZES, J.P.; LAPUATINI, M.; ANTONIOLLI, Z.I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C.G. Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de

Trichoderma spp.(Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f.sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n,1, p.132-139, 2010.

NAPPO Pest Alert – Official Pest Reports for Mexico. Detecção de la Roya de la Teca (*Olivea tectonae*), (Rac.) Thirun. Chaconiaceae, en el municipio de Las Choapas, Veracruz, Mexico – 04/11/2005. México, 2005. Disponível em:

<<http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=142&keyword=Olivea%20tectonae>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

PÉREZ, M.; LÓPEZ, M. O.; MARTÍ, O. *Olivea tectonae*, leaf rust of teak, occurs in Cuba. **New Diseases Reporter**. Cuba, v.17, 2008.

PIERI, C.; PASSADOR, M. M.; FURTADO, E.L.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Novas observações sobre a ocorrência da ferrugem da teca (*Tectona grandis*) no Brasil e revisão taxonômica do patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n.4, p.199-201, 2011.

PORTER, T. M. e BRIAN GOLDING, G. Are similarity-or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons?. **New Phytologist**, v.192, n.3, p.775-782.2011.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; CALDEIRA, S. F. Impactos potenciais de doenças em espécies florestais emergentes no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.35, n.1, p.83-85, 2010. (Suplemento).

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A. e MILLER, A. N. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.16, p.6241-6246. 2012.

SILVA-SOUZA, R. R. **Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de *Eucalyptus cloeziana* e sua relação com a ferrugem.** 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) -Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M., e KUMAR, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v.28, n.10, p.2731-2739, 2011.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosopholia*. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.11, n.3, p. 513-522, 1990.

CAPÍTULO II

ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE ALTERNATIVO DA FERRUGEM DA TECA

ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE ALTERNATIVO DA FERRUGEM DA TECA

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.), capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) e noni (*Morinda citrifolia* L.) na germinação de urediniósporos de *Olivea neotectonae*, agente causal da ferrugem da teca (*Tectona grandis*); verificar o efeito fitotóxico destes óleos essenciais em mudas de teca, bem como o uso dos óleos essenciais no controle da ferrugem em mudas de teca aplicados de forma preventiva e curativa. Verificou-se que o aumento das concentrações dos óleos essenciais inibiram a germinação dos urediniosporos. O óleo essencial de noni e capim-limão inibiram 100% da germinação dos urediniósporos, a partir das concentrações de 2 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. No entanto, no teste de fitotoxicidade estes óleos essenciais, quando aplicados em mudas de teca, causaram fitotóxicidade a partir das concentrações de 2 e 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Foram identificados os constituintes

químicos majoritários no óleo essencial de folhas de capim-limão o geranial (41,46%) e neral (32,43%), no capim-citronela o citronelal (30,07%), no matruz o α -terpinol (41,97%), e no óleo essencial extraído a partir de frutos de noni maduros foi o ácido octanóico (64,03%). A aplicação de forma preventiva dos óleos essenciais de noni e capim-limão apresentaram potencial de controle da ferrugem da teca, pois foram observados os menores valores de área abaixo da curva de progresso da doença.

Palavras-chaves: *Olivea neotectonae*, *Tectona grandis*, patologia florestal.

ESSENTIAL OILS IN ALTERNATIVE CONTROL OF RUST TECA

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of essential oils lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.), citronella grass (*Cymbopogon Nardus* L), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) and noni (*Morinda citrifolia* L.) on germination urediniospores *Olivea neotectonae*, causal agent of rust teak (teak); check the phytotoxic effect of these essential oils in teak seedlings, as well as the use of essential oils in controlling rust in applied teak seedlings preventive and curative manner. It was found that increased concentrations of essential oils inhibited germination urediniospore. The essential oil of noni and lemongrass inhibited 100% germination of urediniospores, from the concentrations of 2 and 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectively. However, phytotoxicity test these essential oils, when applied teak seedlings, caused phytotoxicity from the concentrations of 2 and 1.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectively. The majority chemical constituents were identified in the essential oil of lemongrass leaves the geranial (41.46%) and neral (32.43%), the grass citronella citronellal

(30.07%) in matruz the α - terpineol (41.97%) and essential oil extracted from mature noni fruit was octanoic acid (64.03%). The application preventively essential noni and lemongrass oils showed potential of teak rust control because the smaller values of area under the disease progress curve were observed.

Keywords: *Olivea neotectonae*, *Tectona grandis*, forest pathology.

INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas enfrentados pelos produtores de teca (*Tectona grandis* L. f.) são as doenças que acometem a planta desde a fase de viveiro até às plantas adultas. Dentre as principais doenças destaca-se a ferrugem da teca, causada pelo fungo *Olivea neotectonae* (= *Chaconia tectonae* T.S. & K. Ramark). Os sintomas iniciam na superfície abaxial da folha, causando manchas cloróticas que progridem rapidamente para lesões, que podem levar à necroses até a queima generalizada nas folhas, e conseqüentemente, ocorre a desfolha completa. Na parte abaxial pode-se observar urédias pulverulentas de coloração amarela laranja devido à formação intensiva de urediniósporos (ARGUEDAS, 2004; BONALDO et al., 2011).

Existem poucos estudos em relação ao controle dessa doença. No entanto, recomendam-se inspeções dos viveiros de produção de mudas e erradicação das plantas que apresentarem sintomas (FERRARI et al., 2011), uma vez que, atualmente não existem fungicidas registrados no país recomendados para o controle dessa doença.

Diversos estudos buscam métodos alternativos que possam ser empregados para o controle de diversos fitopatógenos, que não afetam o meio ambiente e a saúde humana. Visando a utilização de produtos naturais para reduzir o impacto causado pelos agrotóxicos, encontram-se o emprego de extratos vegetais, hidrolatos e óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais, aromáticas e condimentares (PEREIRA et al., 2006; DHIMA et al., 2010). Pesquisas têm demonstrado atividade fungitóxica de óleos essenciais de diversas espécies medicinais, bem como o efeito de constituintes químicos isolados dos mesmos (CHANG et al., 2008; ABDOLAHY et al., 2010; CARLOS et al., 2010; BARBOSA et al., 2011).

Considerando a importância de se buscar alternativas de controle sustentável que possam contribuir no manejo de doenças, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.), capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) e noni (*Morinda citrifolia* L.) na germinação de urediniosporos de *Olivea neotectonae*, agente causal da ferrugem da teca (*Tectona grandis*);

verificar o efeito fitotóxico destes óleos essenciais em mudas de teca, bem como o uso dos óleos essenciais no controle da ferrugem em mudas de teca quando aplicados de forma preventiva e curativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de mudas de teca

Sementes de teca provenientes de Cáceres – MT, foram semeadas em bandejas plásticas contendo uma mistura de solo e substrato comercial na proporção 2:1. Após a germinação as plântulas foram transferidas para sacos de poliestireno, contendo 2 kg de substrato, composto de uma mistura de solo, esterco e substrato comercial na proporção 2:1:1. A irrigação foi realizada diariamente com o auxílio de regador manual.

Obtenção dos urediniósporos

Os urediniósporos de *Olivea neotectonae* foram coletados a partir de folhas de teca infectadas, apresentando sintomas de ferrugem, em plantio experimental de teca, com plantas de dois a quatro anos de idade, em área de Cerrado, no município de Gurupitô. Em seguida, os urediniósporos foram removidos com o auxílio de um pincel de cerdas macias, raspando-se levemente sobre as urédias presentes nas folhas. Posteriormente, foram depositados em frascos âmbar de

5 mL e armazenados em geladeira à -2°C por um período máximo de uma semana.

Coleta do material vegetal e obtenção dos óleos essenciais

As folhas de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.), capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L) e mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) foram coletadas no município de Gurupi - TO, e desidratadas à temperatura ambiente durante cinco dias. Frutos maduros de noni (*Morinda citrifolia* L.) foram coletados na região do estudo, submetidos à assepsia e cortados em pequenos cubos. Para a extração dos óleos essenciais utilizou-se 200 g de cada material vegetal. A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando-se o Clevenger, submetido à fervura por um período de duas horas. Após a extração, o óleo essencial foi coletado na forma de sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta, depositado em frascos âmbar, devidamente identificados e armazenados em geladeira à 4°C (SEIXAS et al., 2012, adaptado).

Inibição da germinação de urediniósporos *in vitro*

Para avaliar o efeito dos óleos essenciais sobre a germinação de *O. neotectonae*, foram coletados urediniósporos a partir de folhas de plantas de teca com sintomas de ferrugem e preparada uma solução concentrada à 1×10^6 urediniósporos mL^{-1} . Foram testados os óleos essenciais de capim-limão, capim-citronela, mastruz e noni nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4×9 (quatro tipos óleos essenciais e nove concentrações), com quatro repetições. Para a comparação dos resultados, foi utilizado como tratamento controle apenas água destilada.

Os óleos essenciais foram misturados em uma solução de água destilada estéril + surfactante Tween 80 (1%) para a sua completa dissolução. Em frascos de 10 mL foram adicionados 0,05 mL da solução de óleo essencial nas diferentes concentrações e, em seguida, foram depositados 0,05 mL da suspensão de urediniósporos à 1×10^6 urediniósporos mL^{-1} . Os frascos foram armazenados em câmara escura à $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas.

Após o período de incubação, foi realizada a avaliação mediante contagem de urediniósporos germinados e não germinados, sendo um total de 400 urediniósporos contados para cada tratamento (100 urediniósporos por repetição), com o auxílio de microscópio binocular. Foram considerados germinados aqueles urediniósporos que apresentavam tubo germinativo com comprimento superior ao tamanho do urediniósporo avaliado.

Teste de fitotoxicidade

A partir do teste de germinação de urediniósporos foram selecionados os óleos essenciais de capim-limão e noni para efetuar o teste de fitotoxicidade em mudas de teca, utilizando-se as mesmas concentrações, descritas no ensaio anterior (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 9 (óleos essenciais de capim-limão e noni, e nove concentrações), com três repetições. Para a comparação dos resultados, foi utilizada uma testemunha com a aplicação de apenas água destilada nas mudas.

As diferentes concentrações dos óleos essenciais foram obtidas diluindo-se separadamente, o óleo essencial a uma solução de água destilada estéril + surfactante Tween 80 (1%), e em seguida, agitadas até a completa homogeneização. Para a aplicação dos óleos essenciais foram utilizados borrifadores manuais contendo 30 mL de solução. As plantas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento e mantidas à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Decorridas às 24 horas, foi efetuada a avaliação de fitotoxicidade 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.

Análises cromatográficas dos óleos essenciais

As análises qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa CG-EM. O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu GC-210

equipado com detector seletivo de massa modelo QP2010 Plus. O equipamento foi 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: 60 – 240°C (3°C min⁻¹); temperatura do injetor: 220°C; gás carreador hélio; injeção splitless 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 de fonte de íons e da interface: 200°C. Foi injetada, nas mesmas condições das amostras, uma série homóloga de n-alcenos (C₉H₂₀..... C₂₆H₅₄). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Nist e Wiley 229 e o índice de retenção, calculado para cada constituinte, foi comparado com o índice de retenção tabelado, de acordo com Adams (2007).

A quantificação dos teores dos compostos foram expressos em porcentagem tendo como base a normatização de áreas, que foram obtidas mediante cromatógrafo gasoso equipado com um detector de ionização de chamas (DIC), por meio de aparelho Shimadzu GC-210, nas seguintes condições: 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; com programação da coluna: temperatura inicial de 60°C com uma taxa de aquecimento de 3°C min⁻¹ até 240°C, em seguida, passando para uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ até 300°C, permanecendo nessa temperatura por 10 min; gás de arrastre nitrogênio (1,18 mL min⁻¹); taxa de Split 1:50; pressão na coluna de 115 KPa e volume injetado de 1 µL de uma solução 1:1000 em hexano.

Controle preventivo e curativo da ferrugem da teca *in vivo*

A partir dos resultados obtidos no teste *in vitro* e de fitotoxicidade, foram estabelecidas para a implantação dos ensaios de controle preventivo e curativo, diferentes concentrações de óleos essenciais de noni e capim limão, em função da concentração de óleo essencial que apresentou a mínima fitotoxidez às mudas de teca. Para o óleo essencial de noni utilizou-se as concentrações: 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 e 4 µL mL⁻¹ e para o óleo essencial de capim-limão estabeleceu-se as concentrações: 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5 e 1,75 µL mL⁻¹

1. Como testemunha utilizou-se apenas água destilada. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com três repetições.

As concentrações dos óleos essenciais foram preparadas como descrito anteriormente no teste de fitotoxicidade. A solução de urediniósporos foi preparada, adicionando-se 3 g de urediniósporos a 500 mL de água destilada, homogeneizada em agitador magnético. Em seguida, foi realizada a quantificação dos urediniósporos em câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração à 10^6 urediniósporos mL⁻¹.

Para o ensaio do controle preventivo foram utilizadas três mudas de teca completamente sadias, apresentando cinco folhas cada planta, nas quais foram previamente aplicadas 20 mL de solução dos óleos essenciais de noni e capim-limão nas suas respectivas concentrações, até o ponto de escorrimento da solução, utilizando-se pulverizador manual. Após 24 horas foi efetuada a inoculação de 20 mL de solução de urediniósporos, por planta, utilizando-se pulverizador manual. Após a aplicação da solução de urediniósporos as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas

à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, proporcionando condições adequadas para o desenvolvimento do patógeno.

Aos dois dias após inoculação, foram realizadas cinco avaliações de severidade da doença em intervalos regulares de quatro dias, adotando-se a escala de notas adaptada por Santos et al. (2005) onde: 0 = planta sadia; 1 = menos de 1% da área foliar doente; 3 = 1 a 5% da área foliar doente; 5 = 6 a 25% da área foliar doente; 7 = 26 a 50% da área foliar doente; 9 = mais que 50% da área foliar doente. A partir do valor médio de percentual da área foliar doente correspondente a cada nota na escala de notas de severidade de doença foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), segundo Shaner e Finney (1977).

No ensaio do efeito curativo foram aplicadas 20 mL de solução das diferentes concentrações dos óleos essenciais de noni e capim-limão em folhas de mudas de teca, apresentando sintomas de ferrugem com nota de severidade da doença em grau 1, sendo menos de 1% da área foliar doente. Aos quatro dias após inoculação, foram realizadas cinco avaliações de severidade da doença, em intervalos regulares de quatro dias, adotando-

se a escala de notas descrita anteriormente (SANTOS et al., 2005).

Os dados obtidos no ensaio *in vitro* e *in vivo* da inibição da germinação e no controle preventivo e curativo *in vivo* foram submetidos à análise de regressão com auxílio do programa computacional Sigma Plot.10.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inibição da germinação de urediniósporos *in vitro*

Em relação à germinação de urediniósporos de *O. neotectonae*, não há relatos na literatura quanto ao efeito inibitório proporcionado a partir da utilização de óleos essenciais. Na figura 1, verificou-se que os óleos essenciais de noni, mastruz, capim-limão e capim-citronela inibiram a germinação dos urediniósporos conforme aumentou-se as concentrações dos óleos essenciais.

O óleo essencial de frutos de noni e capim-limão inibiram completamente a germinação de urediniósporos a partir das concentrações de 2 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ respectivamente. Embora, exista carência de informações sobre a atividade biológica do óleo essencial de frutos de noni em fungos fitopatogênicos, Sahoo et al. (2012) observaram o potencial fungitóxico do extrato de folhas de noni sobre diferentes espécies fúngicas consideradas importantes fitopatógenos em diversas culturas. Quanto à atividade fungitóxico do óleo essencial de capim-limão, pesquisas tem apontado que seu constituinte majoritário citral (geraniale + neral) tem demonstrado potencial na

inibição de crescimento micelial de fitopatógenos, que segundo Guimarães et al. (2011) evidencia a atividade fungitóxica e a importância desse constituinte na atividade do óleo essencial de capim-limão.

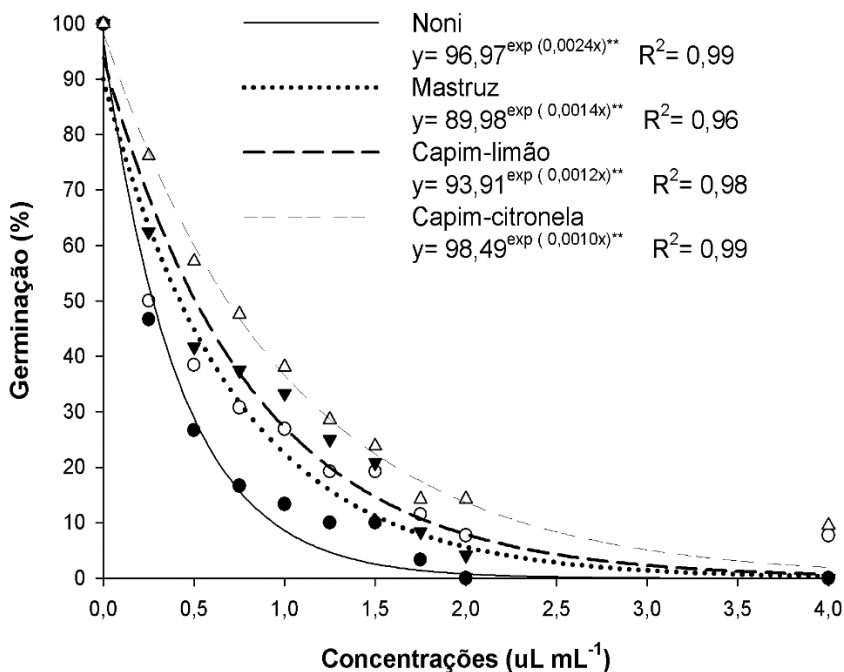


Figura 1. Porcentagem de germinação de urediniosporos de *Olivea neotectonae* submetidos a diferentes concentrações dos óleos essenciais (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 E 4 µL mL⁻¹) de noni (*Morinda citrifolia* L.), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.) e citronela (*Cymbopogon nardus* L.). ** significativo pela teste F a ao 1% de probabilidade.

A germinação de urediniósporos de *O. neotectonae* sob o efeito de doses crescentes de óleos essenciais de mastruz e capim-citronela, apresentou decréscimo, atingindo na maior concentração (4 $\mu\text{L mL}^{-1}$), percentual de germinação de 7,69 e 9,52%, respectivamente. Pereira et al. (2012), demonstraram *in vitro* a inibição de germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* sob efeito do óleo essencial de capim-citronela. Kumar et al. (2007) constataram que o óleo essencial de mastruz apresentou amplo espectro fungitóxico, inibindo completamente o crescimento micelial de *Aspergillus fumigatus*, *Botrydiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryanum* e *Sclerotium rolfsii*. Borges et al. (2013) testando o efeito fungitóxico do extrato de folhas de mastruz, observaram 54,25% de inibição de germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

Efeito fitotóxico dos óleos essenciais de noni e capim-limão em plantas de teca

Observou-se que o aumento nas concentrações dos óleos essenciais de noni e capim-limão causaram fitotoxidez em mudas de teca a partir das concentrações

de 1,5 e 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 2). O principal sintoma de fitotoxicidade nas plantas de teca foi o surgimento de necroses, principalmente nas nervuras foliares.

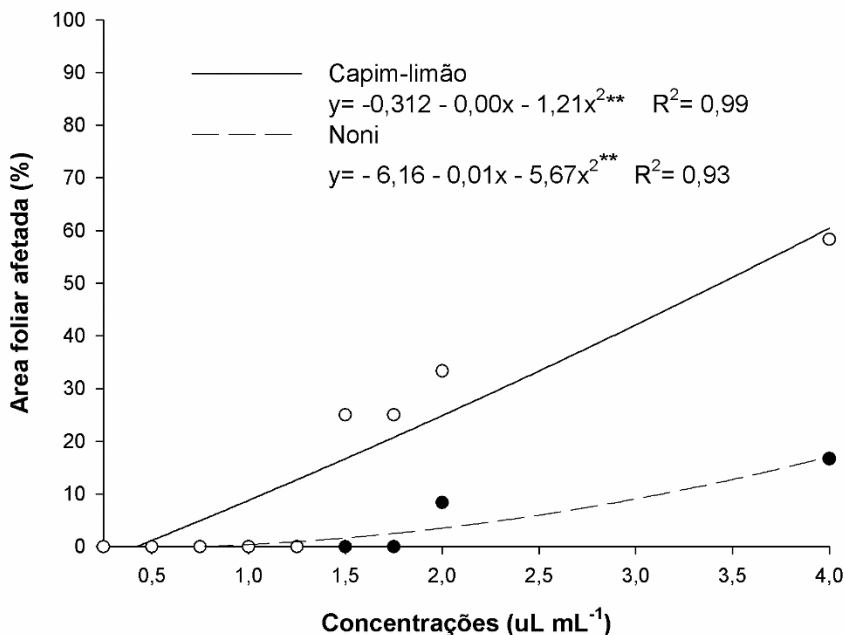


Figura 2. Percentagem de área foliar afetada pela fitotoxicidade de diferentes concentrações (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogom citratus* L.) e noni (*Morinda citrifolia* L.) em plantas de teca. ** significativo pela teste F a ao 1% de probabilidade.

O óleo essencial de noni apresentou baixa fitotoxicidade às mudas de teca nas concentrações de 2 e

4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ com percentuais de área foliar afetada de 8,3 e 16,7%. O óleo essencial de capim-limão apresentou maior fitotoxicidade às mudas de teca do que o óleo essencial de noni. Nas concentrações de 1,5 e 1,75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de óleo essencial de capim-limão houve leve necrose nas folhas, afetando 25% da área foliar. Na concentração de 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ a área foliar afetada foi de 33,3%, apresentando necrose moderada. A concentração de 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ promoveu alta necrose nas folhas com 58,3% de área foliar afetada.

As necroses decorrentes da ação fitotóxica do óleo essencial reduzem a área foliar interferindo no processo fotossintético, e conseqüentemente, impedindo a produção de fotoassimilados. Na literatura, são poucos os estudos que discutem o efeito fitotóxicos dos óleos essenciais sobre espécies florestais, principalmente a teca. Em outras culturas, como olerícolas e anuais diversos trabalhos já foram desenvolvidos. Sarmento-Brum et al. (2014), ao avaliar fitotoxicidade do óleo essencial de capim-limão em plantas de melancia (*Citrullus lanatus*), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e arroz (*Oryza sativa*) observaram que na concentração de 0,5% não foi fitotóxico para as plântulas destas culturas.

Mesmo se tratando de uma espécie florestal caducifólia, o teste de fitotoxicidade é muito importante em estudos do potencial de uso de óleos essenciais no controle alternativo de doenças ainda em viveiros. Na maioria dos estudos, os resultados promissores apresentados nos testes *in vitro* nem sempre são extrapolados para os testes *in vivo*, principalmente devido aos danos que os óleos essenciais ocasionam na planta. Neste caso, os testes de fitotoxicidade servem de base para a definição de doses que podem ser aplicadas nas plantas sem provocar injúrias.

Análises cromatográficas dos óleos essenciais

Na tabela 1 observa-se a constituição química dos óleos essenciais de capim-limão, noni, capim-citronela e mastruz. Foram identificados os constituintes majoritários geranial (41,46%) e neral (32,43%) no óleo essencial de capim-limão; o ácido octanóico (64,03%) no óleo essencial de frutos de noni; citronelal (30,07%), geraniol (19,15%) e citronelol (11,68%) no óleo essencial de capim-citronela; e no óleo essencial de mastruz foram identificados o α -terpinol (41,97%), α -terpineno (18,78%), p-cinemo (16,11%) e iso ascaridol (15,9%).

Tabela 1. Constituintes químicos dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.), noni (*Morinda citrifolia* L.), citronela (*Cymbopogon citratus* L.) e mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) identificados por CG/EM e seus respectivos teores expressos em percentagem. Gurupitô, 2016.

Óleo essencial de capim-limão			
Constituintes	TR	IR	(%)
Mirceno	7,742	986	9,73
(Z)- β -ocimeno	9,344	1020	0,32
(E)- β -ocimeno	9,753	1029	0,16
Linalol	11,845	1074	1,64
Neral	17,885	1209	32,43
Geraniol	18,375	1220	4,52
Geranial	19,233	1239	41,46
2-undecanona	20,099	1359	0,35
Geranil acetato	23,737	1443	0,42
E-Cariofileno	31,997	1641	0,17
Outros	-	-	8,8
Total			100
Óleo essencial de noni			
Constituintes	TR	IR	(%)
2-heptanona	5,013	927	0,14
Hexanoato de metilo	5,787	944	1,08
Etil-hexanoato	7,996	991	0,5
Acido hexanóico	8,688	1006	8,64
Butanóico, éster 4-pentenilo	10,395	1043	0,19
Octamoate metil	12,755	1094	5,35
Acetato octanoato	15,846	1163	3,58
Acido - octanóico	17,413	1198	64,03
Hexanoato de 4-pentene	18,602	1225	4,3
Ácido decanóico, éster etílico	21,39	1288	0,19
Ácido butanóico, 3-metil	26,995	1420	10,16
Hexil Caprilato	31,939	1540	0,37
Outros	-	-	100

Óleo essencial de capim-citronela			
Constituintes	TR	IR	(%)
Limoneno	9,157	1070	2,53
Linalol	11,852	1074	0,5
Citronelal	14,100	1124	30,07
Isopulegol	14,378	1131	0,33
Citronelol	17,314	1196	11,68
Geraniol	18,412	1221	19,15
Geranial	19,094	1236	0,21
Acetato de Citronelol	22,476	1313	2,34
Acetato de Geraniol	23,704	1342	2,54
β -Elemeno	24,191	1354	2,31
α -Humeleno	26,917	1418	0,11
α -Muroleno	26,727	1413	0,13
Germacreno	27,967	1443	1,88
β -Selineno	28,302	1451	0,13
α -Muroleno	28,703	1461	0,34
γ -Cadineno	29,283	1474	1,19
Delta Cadineno	29,488	1479	2,35
α -Elemol	30,735	1510	10,76
γ -Eudesmol	33,922	1588	0,66
α -Muurolol	24,293	1341	0,33
α -Cadinol	34,711	1608	5,13
β -Elemol	35,477	1628	0,87
Outros	-	-	100

Óleo essencial de mastruz			
Constituintes	TR	IR	(%)
α -Terpineno	8,751	1007	18,78
ρ -cinemo	9,026	1013	16,11
Limoneno	9,171	1016	0,38
Terpineno	10,228	1040	0,55
Linalol	11,871	1075	0,13
Trans-p-2,8-menthadien-1-ol	12,838	1096	0,07
Cyclooctanone	13,261	1106	0,55
α -Benzenometanol	15,653	1159	0,26
1,4-Epidioxy-p-Menth-2-eno	17,141	1192	1,28

α -Terpineol	18,009	1211	41,97
Ascaridole	18,194	1216	0,06
Óxido de piperitona	18,446	1221	0,45
z-Ascaridole	18,595	1225	1,23
Ascaridole	19,217	1239	0,22
3-Hexino-2,5-diol, 2,5-dimetil	19,413	1243	1,02
3-Hexino-2,5-diol, 2,5-dimetil	20,301	1281	0,61
Iso ascaridol	20,738	1286	15,9
Outros	-	-	100

TR= tempo de retenção; IR= índice de retenção calculado

Elevados teores de geranial e neral na composição química do óleo essencial de capim-limão foram observados por Pinto et al. (2014), com teor médio de aproximadamente 51% e 36%, respectivamente. Farine et al. (1996) identificaram como constituinte majoritário no óleo essencial de frutos de noni o ácido octanóico com 58%. Em extratos de frutos de noni, já foram identificados um total de 160 compostos fitoquímicos, os quais a maioria dos constituintes são compostos fenólicos, ácidos orgânicos e alcalóides (CHAN-BLANCO et al., 2006).

Os resultados de cromatografia do óleo essencial de capim-citronela foram semelhantes aos obtidos por outros autores, Andrade et al. (2012) encontraram no óleo essencial de capim-citronela os constituintes majoritários citronelal (47,12%), geraniol (18,56%) e citronelol (11,07%). Bai et al (2011) identificaram (Z)-ascaridole

(27,27%), p-cymene (19,05%), isoascaridole (14,75%), α -pinene (6,33%) e α -terpinene (5,12%) como os principais componentes do óleo essencial de mastruz. Jaramillo et al. (2012), também avaliando o óleo essencial de matruz, constataram que os compostos majoritários foram α -terpineno (60,29 %), seguido de p-cimeno (20,49 %), 4-careno, (7,96 %) e trans-ascaridol (1,91 %).

Controle preventivo e curativo da ferrugem da teca

Observou-se que o aumento das concentrações dos óleos essenciais de capim-limão e noni, promoveu redução na severidade da ferrugem da teca, apresentando baixos valores de área abaixo da curva de progresso da doença (Figura 3 e 4).

O uso de óleo essencial de capim-limão foi muito eficiente quando aplicado de forma preventiva em mudas de teca, apresentando baixos valores de AACPD a partir da concentração de $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$, e ausência de qualquer sintoma característico de ferrugem nas concentrações de 1,5 e $1,75 \mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 3). Verificou-se também, comparando com o tratamento testemunha um bom nível de controle quando o óleo essencial foi aplicado de forma curativa, porém, houve o desenvolvimento de lesões

mesmo quando se utilizou a maior concentração de óleo essencial ($1,75 \mu\text{L mL}^{-1}$).

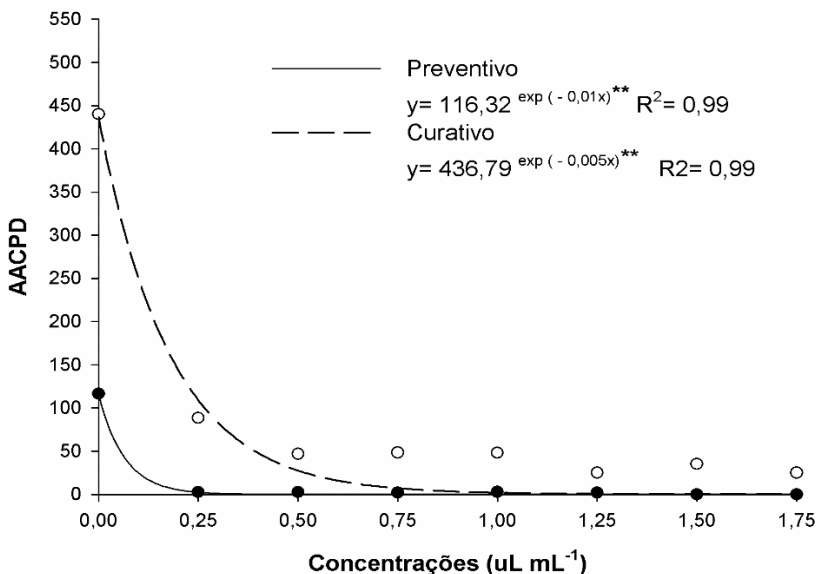


Figura 3. Área da Curva de Progresso da Doença (AACPD) da ferrugem da teca sob diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.) ($0,25$, $0,50$, $0,75$, 1 , $1,25$, $1,5$, e $1,75 \mu\text{L mL}^{-1}$). ** significativo pela teste F a ao 1% de probabilidade.

Com relação ao óleo essencial de noni, observou-se efeito semelhante ao verificado nas avaliações com o óleo essencial de capim-limão, porém, com maior eficiência de controle da ferrugem pelo óleo essencial de capim-limão aplicado de forma preventiva. Verificou-se

que o controle preventivo do óleo essencial de frutos de noni, inibiu a proliferação do patógeno, levando a ausência de qualquer sintoma de ferrugem apenas na concentração de 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, enquanto que no controle curativo, houve o desenvolvimento do patógeno com a presença de sintomas de ferrugem em todas as concentrações testadas (Figura 4)

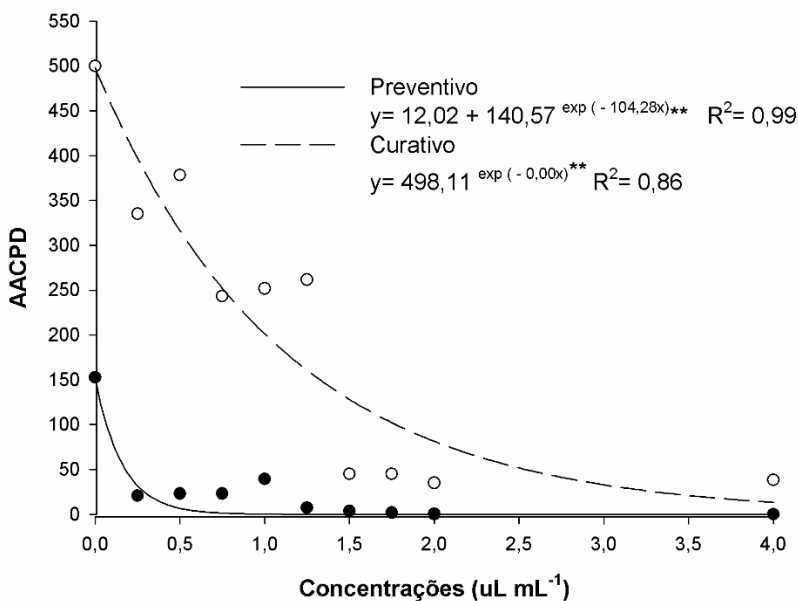


Figura 4. Área da Curva de Progresso da Doença (AACPD) da ferrugem da teca sob diferentes concentrações do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia* L.) (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$). ** significativo pela teste F a ao 1% de probabilidade.

No controle preventivo o óleo é aplicado antes de a infecção ocorrer nos tecidos da planta. Desta forma, provavelmente, o óleo essencial funciona como uma barreira impedindo a germinação e penetração do tubo germinativo do patógeno na superfície das folhas. Com relação à diferença de eficiência de controle verificada entre os óleos essenciais de capim-limão e noni, pode ser atribuída ao fato do constituinte majoritário do noni (ácido octanóico) ser bastante volátil quando em contato com o ar livre, e assim, devido a esta característica, possivelmente apresentou baixo efeito residual em relação ao geranial, constituinte majoritário do óleo essencial de capim-limão.

A utilização de óleos essenciais na redução da severidade da ferrugem da teca em condições de campo é escassa, sendo provavelmente este o único estudo a ser reportado até o momento. Resultados semelhantes ao obtido neste estudo têm relatado a eficiência de óleos essenciais no controle de doenças em outros patossistemas. Medice et al, (2007) verificaram que os óleos essenciais de eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), capim-citronela (*Cymbopogon nardus*), nim (*Azadirachta indica*) e tomilho (*Thymus vulgaris*)

retardaram o desenvolvimento da ferrugem asiática da soja (*P. pachyrhizi*) em casa vegetação. Pereira et al, (2012), avaliando óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), capim-citronela (*Cymbopogon nardus*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), árvore-de-chá (*Melaleuca* sp.), tomilho (*Thymus vulgaris*), nim (*Azadirachta indica*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*) para o controle da ferrugem do cafeeiro, causada pelo patógeno *Hemileia vastatrix*, constataram que todos os óleos promoveram o controle parcial da doença.

O controle parcial da ferrugem da teca promovido pela aplicação dos óleos essenciais neste estudo, possivelmente, se deve à presença de compostos tóxicos em grande quantidade nos óleos essenciais utilizados, que tem a capacidade de induzir um efeito protetor, Por outro lado, os outros compostos em menores quantidades podem estar contribuindo indiretamente para o controle da doença, mediante a indução de reposta de defesa da planta. Para poder confirmar esta hipótese é preciso outros estudos visando à quantificação de enzimas relacionadas à defesa da planta após a aplicação destes óleos.

Como existem poucos estudos em relação ao controle da ferrugem na teca, o uso dos óleos essenciais torna-se uma alternativa, principalmente quando aplicado em mudas ainda nos viveiros, evitando o desenvolvimento inicial do patógeno na planta, e conseqüentemente, o progresso da doença.

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de capim-limão, citronela, mastruz e noni apresentaram efeito inibitório na germinação de urediniósporos de *Olivea neotectonae*, destacando-se os óleos essenciais de noni e capim-limão, que a partir das concentrações de 2,0 e 4,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente, inibiram 100% a germinação dos urediniósporos.

A aplicação de óleo essencial de capim-limão e noni em mudas de teca causaram fitotoxidez a partir das concentrações de 1,5 e 2,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente, com o surgimento de leve a moderada necroses das folhas.

Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de capim-limão foram geranial (77,60%) e neral (32,42). No óleo essencial de noni, o constituinte majoritário encontrado foi o ácido octanóico (64,03%), no óleo essencial de capim-citronela foram citronelal (30,07%), geraniol (19,15%) e citronelol (11,68%) e no óleo essencial de mastruz foram o α -terpinol (41,97%), α -terpineno (18,78%), p -cinemo (16,11%) e iso ascaridol (15,9%).

A aplicação preventiva dos óleos essenciais de capim limão e noni nas mudas de teca mostrou-se mais

eficaz na prevenção da ferrugem quando comparada à aplicação de forma curativa.

AGRADECIMENTOS

Ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) do México pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Tocantins e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal por permitir-me a realização do mestrado.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ABDOLAH, A.; HASSANI, A.; GHOSTA, Y.; JAVADI, T.; MESHKATALSADAT, M. H. Essential oils as control agents of postharvest *Alternaria* and *Penicillium* rots on tomato fruits. **Journal of Food Safety**, v.30, p.341-352, 2010.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 800 p, 2007.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLETT, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.2, p.399-408, 2012.

ARGUEDAS, M. La roya de La teça *Olivea tectonae* (Rac.): consideraciones sobre su presencia em Panamá y Costa Rica. **Revista Forestal Kuru**, v.1, n.1, 2004 (Nota Técnica).

BAI, C. Q.; LIU, Z. L.; LIU, Q. Z. Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* aerial parts. **Journal of Chemistry**, v.8, n.S1, p.143-148, 2011.

BARBOSA, S. F.; LEITE, D. L. G.; ALVES, M. S.; NASCIMENTO, F. A.; D'ÁVILA, A. V.; Costa AC. Insecticide effects of *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests

and natural enemies in commercial tomato plantation. **Acta Scientiarum** 2011; 33(1): 37-43.

BONALDO, M. S.; BARCELI, C. A.; TRENTO, A. R.; GASPAROTTO, F.; TAFFAREL, C. Relato oficial da ocorrência de *Olivea tectonea* em teca (*Tectona grandis*) no Brasil. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v.37, n.3, p.153, 2011.

BORGES, D. I.; ALVES, E.; DE MORAES, M. B.; OLIVEIRA, D. F. Efeito de extratos e óleos essenciais de plantas na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Rev. bras. plantas med**, v.15, n.3, p.325-331,2013.

CARLOS, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; ITAKO, A. T.; BONALDO, S. M.; MESQUINI, R. M.; CARVALHO, J. B.; STANGARLIN, J. R. Efeito de extrato bruto e óleo essencial de *Achillea millefolium* em desenvolvimento *in vitro* de *Corynespora cassiicola* e proteção de pepino à mancha de corinespora. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.2, p.309-316, 2010.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, M. A.; REYNES, M.; BRILLOUET, 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.

CHANG, H. T.; CHENG, Y. H.; WU, C. L.; CHANG, S. T.; CHANG, T. T.; SU, Y. C. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6266-6270, 2008.

COGLIATTI, M.; JUAN, V. F.; BONGIORNO, F.; DALLA VALLE, H.; ROGERS, W, J. Control of grassy weeds in annual canarygrass. **Crop Protection**, v.30, p.125-129, 2011.

DEQUECH, B. T. S.; RIBEIRO, P. L.; SAUSEN, D. C.; EGEWARTH, R.; KRUSE, D. N. 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.

DHIMA, K.; VASILAKOGLU, I.; GARANE, V.; RITZOULIS, C.; LIANOPOULOU, V.; PANOU-PHILOTHEOU, E. Competitiveness and essential oil phytotoxicity of seven annual aromatic plants. **Weed Science**, v.58, n.4, p.457-465, 2010.

FARINE, J. P.; LEGAL, L.; MORETEAU, B.; LE QUERE, J. L. Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. **Phytochemistry**, v.41, n.2, p.433-438, 1996.

FERRARI, J, T. **Ferrugem (*Olivea tectonae*) em plantas de teca**. São Paulo: Instituto Biológico 2011: 6. (Documento Técnico, 009).

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 milhopioca. **Planta Daninha**, v.27, p.1095-1103, 2009.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, G. M.; SOUSA, E. P.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e

fungitóxicas do óleo essencial de capim-limão e do citral¹. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

JARAMILLO, C. E. B.; DUARTE R. E.; DELGADO, W. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.17, n.1, p.54-64, 2012.

KUMAR, R.; MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K.; TRIPATHI, Y. B. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.2, p. 159-164, 2007.

McCLATCHEY, W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integral Cancer Therapy**, v.1, p.110–120, 2002.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; MAGNO JUNIOR, R. G.; LOPES, E. A. G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. e P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, p.83-90, 2007.

PALU, K. A.; KIM, A.; WEST, J. B.; DENG, S.; JENSEN, J.; WHITE, L. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: Its molecular mechanisms of action **Journal of Ethnopharmacology**. 2008.

PEREIRA, B. R.; LUCAS, C. G.; PERINA, J. F.; ALVES, E.; Essential oils for rust control on coffee plants. **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, v. 36, n. 1, p. 16-24, 2012.

PEREIRA, M. C.; VILELA, R. G.; COSTA, S. A. M. L.; SILVA, F. R.; FERNANDES, F. A.; FONSECA, N. W. E.; PICCOLI, H. R. Inibição do desenvolvimento fúngicos através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, v.30, n.4, p 731-738, 2006.

PEREIRA, S. R.; SUMITA, C. T.; FURLAN, R. M.; JORGE, C. O. A.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista da Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-8, 2004.

PINTO, D. A.; MANTOVANI, E. C.; MELO, E. D. C.; SEDIYAMA, G. C., e VIEIRA, G. H. S. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.16, n.1, p.54-61, 2014.

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, 425-429, 2012.

SANTOS, A.; PADUAN, H. R., GAZIN, C. Z.; JACOMASSI, E.; OLIVEIRA, S. P.; CORTEZ, G. A. D.; CORTEZ, R. E. L. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.2, p.436-441, 2009.

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

SARMENTO, C. B. R; CASTRO, G. H.; GAMA, R. F.; CARDON, H. C.; SANTOS, R. G. Phytotoxicity of essential oils in watremelon, bean and rice plants. **Journal of Biotechnology and biodiversity**, v.5, n.2, p.101- 109, 2014.

SEIXAS, P. T. L.; CASTRO, H. G.; CARDOSO, D. P.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; NASCIMENTO, I. R. Bioactivity of essential oils on the fungus *Didymella bryoniae* of the cucumber culture, **Brazilian Journal of Applied Technology For Agricultural Science**, v.5, n.3, p.61-66, 2012.

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

SOARES, A. S. C.; SILVA, M.; COSTA, B. M.; BEZERRA, S. E. C. Ação inseticida de óleos essenciais sobre a lagarta desfolhadora *Thyrintina arnobia* (stoll) (lepidoptera: geometridae). **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v.6, n.2, p.154-157, 2011.

WANG, M.Y.; WEST, B.; 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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou a importância da utilização das ferramentas de análises de microscopia eletrônica de varredura assim como análises moleculares para a identificação do fungo *Olivea neotectonae* agente causal da ferrugem da teca.

Os óleos essenciais de capim-limão e noni demonstraram capacidade fungitóxica à *O. neotectonae*. e no controle preventivo nas concentrações 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foi eficaz na redução da severidade da ferrugem em mudas de teca.