

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

Adriana Falcão Dutra

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE *IN VITRO*  
DE *Phoma pedicelae* (Aveskamp, Gruyter & Verkley) ASSOCIADO  
À *Cedrela fissilis* Vell.**

**Santa Maria, RS  
2018**

**Adriana Falcão Dutra**

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE *IN VITRO* DE *Phoma pedeiae* (Aveskamp, Gruyter & Verkley) ASSOCIADO À *Cedrela fissilis* Vell.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Engenharia Florestal.**

Orientadora: Prof. Dra. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS  
2018

Dutra, Adriana Falcão  
Identificação, caracterização e controle in vitro de  
Phoma pedaeiae (Aveskamp, Gruyter & Verkley) associado à  
Cedrela fissilis Vell. / Adriana Falcão Dutra.- 2018.  
83 p.; 30 cm

Orientadora: Marlove Fatima Brião Muniz  
Coorientadora: Berta Maria Heinzmann  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2018

1. Fitopatologia florestal 2. Manchas foliares 3.  
Patógeno 4. Óleo essencial 5. Controle de doenças I. Muniz,  
Marlove Fatima Brião II. Heinzmann, Berta Maria III.  
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

---

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Adriana Falcão Dutra. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço: Rua Eddie Freire Nunes, n. 1127, bairro Centro, São Borja, RS. CEP: 9760-000

Fone: (0xx)55 99120 8687; Email: adriflorestal@gmail.com

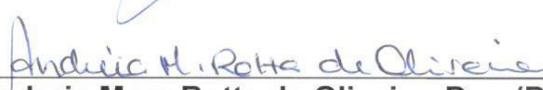
**Adriana Falcão Dutra**

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE *IN VITRO* DE *Phoma pedicelae* (Aveskamp, Gruyter & Verkley) ASSOCIADO À *Cedrela fissilis* Vell.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Engenharia Florestal**.

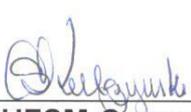
**Aprovada em 26 de fevereiro de 2018:**

  
\_\_\_\_\_  
**Marlove Fátima Brião Muniz, Dra. (UFSM),**  
(Presidente/Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
**Andreia Mara Rotta de Oliveira, Dra. (DDPA/RS)**

  
\_\_\_\_\_  
**Elena Blume, PhD. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Gerusa Pauli Kist Steffen, Dra. (DDPA/RS)**

  
\_\_\_\_\_  
**Stela Maris Kulczynski, Dra. (UFSM-Campus Frederico Westphalen)**

Santa Maria, RS  
2018

*Na ciência não há calçadas reais, e quem aspire alcançar  
seus luminosos cumes, tem que estar disposto a escalar a  
montanha por caminhos acidentados.*

*Karl Marx*

*Prólogo (1872) à edição francesa de O Capital*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria que, através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, possibilitou a realização do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de doutorado.

À Professora Dra. Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação, disponibilidade e compreensão prestada sempre que necessário.

À Professora PhD. Berta Maria Heizmann, pela co-orientação e disponibilidade sempre que solicitada.

À banca examinadora, constituída pela Prof<sup>a</sup> Elena Blume, Prof<sup>a</sup> Stela Maris Kulczynski e as pesquisadoras Dra. Andreia Mara R. de Oliveira e Dra. Gersa Pauli K. Steffen.

À minha família, especialmente à minha mãe Vera, que sempre fez o possível e o impossível para que o trabalho fosse concretizado.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi: Clair Wlaker, Vinicius Fantinel, Jéssica Rabuske, Tales Poletto, Vanessa Alba, Janaina Sarzi, Jéssica Rolim, Lucas Savian, Renata Favaretto e Jaqueline Tomm Khrahn.

Aos colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais: Carlos Pinheiro, Jesica Jetres, Bruno de Oliveira e Nadia Bianchini.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, Fernando Cognato e, especialmente, Maria Nevis Deconto pelos ensinamentos, amizade e especialmente, carinho e atenção durante esses anos de convivência.

A todos os meus amigos, em especial, às Eng. Florestais Daniele Rorato e Genaina Alves.

## RESUMO

### IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE *IN VITRO* DE *Phoma pedeiae* (Aveskamp, Gruyter & Verkley) ASSOCIADO À *Cedrela fissilis* Vell.

AUTORA: Adriana Falcão Dutra  
ORIENTADORA: Marlove Fátima Brião Muniz

A espécie *Cedrela fissilis* Vell. (cedro) apresenta bom crescimento, produzindo madeira de excelente qualidade, causando intensa exploração pelos madeireiros. Um dos principais problemas que comprometem a produção de madeira é a ocorrência de pragas e doenças, causando sérios danos ao hospedeiro e alterações nos processos fisiológicos, levando à morte da planta. Assim, o estudo da atividade biológica de óleos essenciais (OEs) de vegetais pode se constituir em uma forma potencial de controle de doenças em plantas. O objetivo deste estudo foi a identificação e caracterização morfofisiológica e molecular de *Phoma* spp. associado à *Cedrela fissilis* Vell., e avaliar a atividade antifúngica do OE de cedro no controle *in vitro* de *Phoma pedeiae*. Foram coletados folíolos de árvores adultas com sintomas da doença (Santa Maria, RS) e encaminhados ao Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi (UFSM), para isolamento do fungo. O material foi observado em microscópios estereoscópico e ótico, e quando estruturas fúngicas se faziam presentes, eram transferidas para placas de Petri contendo BDA. Após 14 dias de desenvolvimento, o fungo foi purificado por meio da cultura monospórica e transferido para os meios BDA, CA e V8, para caracterização morfofisiológica e molecular. A patogenicidade do fungo foi realizada por meio de aspersão em folhas. As características morfofisiológicas analisadas foram: crescimento micelial (CM), taxa de crescimento micelial (TCM) e índice de velocidade de crescimento (IVCM), esporulação, pigmentação das colônias e caracterização dos conídios. A extração do OE foi conduzida no Laboratório de Extrativos Vegetais, sendo extraído o OE de folíolos jovens de cedro, na estação primaveril dos anos de 2015, 2016 e 2017, por hidrodestilação. A atividade antifúngica *in vitro* do OE dos folíolos foi a partir de colônias puras de *Phoma pedeiae*, nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , além de controle positivo e negativo. Foram realizadas medições diárias do diâmetro da colônia, por 14 dias, sendo obtido o CM, TCM, IVCM e inibição do crescimento micelial. A partir da caracterização molecular, por meio do sequenciamento de genes das regiões ITS e  $\beta$ -tubulina, as sequências foram depositadas no GenBank e tiveram similaridade de 70 e 81%, respectivamente, com o fungo *Didymella pedeiae*, forma sexuada de *Phoma pedeiae*. Os sintomas causados pelo fungo iniciaram aos 20 dias após a inoculação, não diferindo entre os dois isolados, causando a morte dos indivíduos em 50 dias. O fungo apresentou picnídios arredondados de coloração preta, micélio branco e conídios ovais oblongos, sem septo e hialinos. A esporulação no meio de cultura V8 foi superior ao meio BDA e CA. Ao final dos três anos de avaliação foram identificados 45 componentes do OE de folíolos de cedro, correspondendo a, aproximadamente, 90% da composição total do OE, com a predominância das substâncias  $\beta$ -cariofileno, espatulenol e óxido de cariofileno. O OE de cedro apresentou atividade antifungistática relativa frente a *P. pedeiae* a partir da concentração de 0,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Dessa forma, pode ser indicado para uso no controle de patógenos, por se tratar de um metabólito secundário, não causando prejuízos ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** Fitopatologia. Controle de doenças. Óleos essenciais.

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO CONTROL OF *Phoma pedeiaae* (Aveskamp, Gruyter & Verkley) ASSOCIATED WITH *Cedrela fissilis* Vell.

AUTHOR: Adriana Falcão Dutra  
ADVISER: Marlove Fátima Brião Muniz

The species *Cedrela fissilis* Vell. (cedro) presents good growth, producing wood of excellent quality, causing intense exploitation by the loggers. One of the main problems that compromise the production of wood is the occurrence of pests and diseases, causing serious damages to the host and changes in the physiological processes, leading to the death of the plant. Thus, the study of the biological activity of essential oils (OEs) of plants can constitute a potential form of control of diseases in plants. The objective of this study was the identification and morphological and molecular characterization of *Phoma* spp. associated with *Cedrela fissilis* Vell., and to evaluate the antifungal activity of cedro OE in the in vitro control of *Phoma pedeiaae*. Leaflets were collected from adult trees with symptoms of the disease (Santa Maria, RS) and sent to the Elocy Minussi Phytopathology Laboratory (UFMS) for isolation of the fungus. The material was observed on stereoscopic and optical microscopes, and when fungal structures were present, they were transferred to Petri dishes containing BDA. After 14 days of development, the fungus was purified by monosporic culture and transferred to the BDA, CA and V8 media for morphological and molecular characterization. The pathogenicity of the fungus was performed by sprinkling on leaves for two isolates. The morphological characteristics analyzed were: mycelial growth (MG), mycelial growth rate (MGR) and growth rate index (GRI), sporulation, colony pigmentation and conidia characterization. OE extraction was carried out in the Laboratory of Extractive Plants, and OE was extracted from young cedro leaflets, in the spring season of 2015, 2016 and 2017, by hydrodistillation. The in vitro antifungal activity of leaflets OE was on pure colonies of *Phoma pedeiaae*, at concentrations of 0.5, 0.75, 1.0 and 1.5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , in addition to positive and negative controls. Daily measurements of the colony diameter were carried out for 14 days, with MG, MGR, GRI and inhibition of mycelial growth. Sequences were deposited in GenBank and 70 and 81% similarly, with the fungus *Didymella pedeiaae*, sexual form of *Phoma pedeiaae*, by means of the sequencing of genes from the ITS and  $\beta$ -tubulin regions. The symptoms caused by the fungus started at 20 days after inoculation, not differing between the two isolates, causing the death of the individuals in 50 days. The fungus presented rounded pycnidia of black coloration, white mycelium and oblong oval conidia, without septum and hyaline. Sporulation in the V8 culture medium was superior to the BDA and CA medium. At the end of the three-year evaluation, 45 OE components of cedar leaflets were identified, corresponding to approximately 90% of the total OE composition, with the predominance of  $\beta$ -caryophyllene, spathulenol and caryophyllene oxide. The cedro OE presented relative antifungal activity against *P. pedeiaae* starting at the concentration of 0.5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . There fore, it can be indicated for use in the control of pathogens, because it is a secondary metabolite, not causing damage to the environment.

**Keywords:** Phytopathology. Disease control. Essential oils.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Município de Santa Maria, localizado na região Central do Rio Grande do Sul, onde foi realizada a coleta dos isolados de *Phoma* spp. (Fonte: Google Earth, 2018).....24
- FIGURA 2 - A) Coleta de folhas com sintomas da doença em *Cedrela fissilis* Vell., no município de Santa Maria; B) Isolamento do fungo; C) Folhas de *C. fissilis* com sintomas da doença causada por *Phoma* spp.....25
- FIGURA 3 – A) Modelo de câmara úmida, utilizada para inoculação do fungo *Phoma* spp.; B) Câmara úmida em vasos contendo mudas de *Cedrela fissilis* Vell, instaladas em casa de vegetação. (Fonte: Adaptado de Alfenas; Mafia, 2007; Lazarotto, 2013; Dutra, 2017) .....27
- FIGURA 4 – A e B) Sintomas causados por *Phoma* spp., em mudas de *Cedrela fissilis* Vell., aos 50 dias após a inoculação por aspersão. C) Sintomas de *Phoma* spp., observados em microscópio estereoscópico; D) Picnídio e conídios de *Phoma* spp., observados em microscópio ótico (40X) (a: picnídio; b: conídios; c: hifa) .....33
- FIGURA 5 – Caracterização morfológica de *Phoma* spp. A) Colônia pura de *Phoma* spp em meio BDA.; B) Presença de micélio aéreo branco e picnídios puntiformes negros observados em microscópio estereoscópico; C) Conídios obtidos de colônias puras, observados em microscópio ótico; D) Comprimento dos conídios, observados em microscópio ótico.....35
- FIGURA 6 – Aspecto e coloração das colônias de *Phoma* spp. em meio BDA, CA e V8, após 14 dias de incubação. Visualização do lado superior (acima da figura) e inferior da placa de Petri (abaixo da figura) .....37
- FIGURA 7 – Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas.....38

FIGURA 8 – Dendrograma filogenético baseado no método <i>Neighbor-joining</i> a partir de sequências de DNA da região $\beta$ -tubulina. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de <i>bootstrap</i> na qual as repetições foram observadas.....	39
FIGURA 9 – Mecanismos que os óleos essenciais apresentam em relação a atividade antimicrobiana (Adaptado de Khorshidian et al., 2018).....	47
FIGURA 10 – A) Coleta de folhas de <i>Cedrela fissilis</i> Vell.; B) Separação entre folíolos e hastes, e redução com o auxílio de uma tesoura de poda; C) Folíolos após passar pelo multiprocessador; D) Extração do óleo essencial por meio do método de hidrodestilação .....	52
FIGURA 11 – Obtenção do óleo essencial de <i>Cedrela fissilis</i> Vell., nos anos de 2015, 2016 e 2017, por meio do método de hidrodestilação.....	56
FIGURA 12 – Crescimento micelial (mm), aos quatorze dias, de <i>Phoma pedeiaae</i> , submetidos aos tratamentos (C0: testemunha; C-: controle negativo; C1: óleo essencial (OE) 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C2: OE 0,75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3: OE 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C4: OE 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C+: controle positivo.....	62
FIGURA 13 – Crescimento micelial (mm), aos sete dias de, <i>P. pedeiaae</i> , submetidas às diferentes concentrações de OE (C0: testemunha; C1: 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C2: 0,75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3: 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C4: 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), com equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).....	63
FIGURA 14 – Crescimento micelial, aos quatorze dias de <i>Phoma pedeiaae</i> , submetidos aos tratamentos (C0: testemunha; C-: controle negativo; C1: óleo essencial (OE) 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C2: OE 0,75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3: OE 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C4: OE 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C+: controle positivo). A) visualização do lado superior da placa de Petri (acima da figura) e B) visualização do lado inferior da placa de Petri (abaixo da figura) .....	64
FIGURA 15 – Taxa de crescimento micelial – TCM ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) e Índice de velocidade de crescimento micelial – IVCM ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) de <i>Phoma pedeiaae</i> , submetidos aos tratamentos (C0: testemunha; C-: controle negativo; C1: óleo essencial (OE) 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C2: OE 0,75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3: OE 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C4: OE 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C+: controle positivo).....	65

FIGURA 16 – Inibição do crescimento micelial (%), aos quatorze dias, de *Phoma pedicelae*, submetidos aos tratamentos (C0: testemunha; C-: controle negativo; C1: óleo essencial (OE) 0,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C2: OE 0,75  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3: OE 1,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ; C4: OE 1,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) .....66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Patogenicidade de <i>Phoma</i> spp. em função da incidência de manchas necróticas em folhas de <i>Cedrela fissilis</i> Vell .....	32
TABELA 2 – Características morfológicas dos isolados de <i>Phoma</i> spp. obtidas de plantas sintomáticas de <i>Cedrela fissilis</i> .....	34
TABELA 3 – Esporulação ( $\times 10^6$ esporos/mL) de <i>Phoma</i> spp. mensurada aos 14 dias em diferentes meios de cultura. ....	36
TABELA 4 – Acesso no <i>GenBank</i> , cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS.....	38
TABELA 5 – Acesso no <i>GenBank</i> , cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica $\beta$ -tubulina .....	39
TABELA 6 – Tratamentos utilizados para avaliar o a atividade antifúngica <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Cedrela fissilis</i> frente ao fungo <i>Phoma pedicariae</i> .....	54
TABELA 7 – Composição química do óleo essencial, índice de Kovats calculado, índice de Kovats tabelado, e porcentagem da substância presente no OE de folíolos de <i>Cedrela fissilis</i> Vell., nos anos de 2015, 2016 e 2017, Santa Maria, RS.....	59
TABELA 8 – Composição química do <i>pool</i> de óleo essencial índice de Kovats calculado, índice de Kovats tabelado, e porcentagem da substância presente no OE de folíolos de <i>Cedrela fissilis</i> Vell., nos anos de 2015, 2016 e 2017, Santa Maria, RS	67

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>2 CAPÍTULO 1 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Phoma pedeia</i> (Aveskamp, Gruyter &amp; Verkley) ASSOCIADO À <i>Cedrela fissilis</i> Vell. ....</b>	<b>18</b>
2.1 Resumo .....	18
2.2 Introdução.....	19
2.3 Revisão Bibliográfica .....	20
2.3.1 A espécie <i>Cedrela fissilis</i> Vell.....	20
2.3.2 Histórico de doenças foliares no gênero <i>Cedrela</i> .....	21
2.3.3 O gênero <i>Phoma</i> .....	22
<b>2.4 Material e Métodos .....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Obtenção do material vegetal.....	24
2.4.2 Patogenicidade dos isolados de <i>Phoma</i> spp.....	26
2.4.2.1 Inoculação .....	26
2.4.2.2 Avaliação da patogenicidade.....	27
2.4.3 Caracterização morfofisiológica dos isolados patogênicos de <i>Phoma</i> spp .....	28
2.4.3.1 Crescimento micelial .....	28
2.4.3.2 Esporulação .....	29
2.4.3.3 Pigmentação das colônias em meio de cultura .....	29
2.4.3.4 Caracterização dos conídios .....	29
2.4.4 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de <i>Phoma</i> spp.....	30
<b>2.5 Resultados e Discussão .....</b>	<b>31</b>
2.5.1 Isolados de <i>Phoma</i> spp.....	31
2.5.2 Patogenicidade dos isolados de <i>Phoma</i> spp.....	31
2.5.3 Caracterização morfofisiológica dos isolados de <i>Phoma</i> spp.....	34
2.5.4 Esporulação e pigmentação da colônia pura de <i>Phoma</i> spp. em diferentes meios de cultura .....	36
2.5.5 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de <i>Phoma</i> spp.....	37
<b>2.6 Conclusões .....</b>	<b>41</b>
<b>3 CAPÍTULO 2 – OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cedrela fissilis</i> Vell.....</b>	<b>42</b>
3.1 Resumo .....	42

<b>3.2 Introdução</b> .....	<b>43</b>
<b>3.3 Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>45</b>
3.3.1 Definição de óleos essenciais .....	45
3.3.2 Funções ecológicas dos óleos essenciais nas plantas.....	46
3.3.3 Óleo essencial de <i>Cedrela fissilis</i> Vell.....	49
3.3.4 O gênero <i>Phoma</i> spp. ....	50
<b>3.4 Material e Métodos</b> .....	<b>51</b>
3.4.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. ....	51
3.4.1.1 Material vegetal e seu preparo para extração .....	51
3.4.1.2 Obtenção do óleo essencial .....	51
3.4.1.3 Rendimento e identificação da composição do óleo essencial.....	52
3.4.2 Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. no controle <i>in vitro</i> de <i>Phoma pedeciae</i> .....	53
<b>3.5 Resultados e Discussão</b> .....	<b>56</b>
3.5.1 Rendimento e composição química do óleo essencial de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. ....	56
3.5.2 Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de folíolos de <i>Cedrela fissilis</i> Vell. no controle <i>in vitro</i> de <i>Phoma pedeciae</i> .....	62
<b>3.6 Conclusões</b> .....	<b>70</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>71</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>72</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2011), cerca de 49% da área total da América Latina e Caribe são cobertos por floresta, representando cerca de 22% da área de florestas do mundo. O Brasil é um dos cinco países mais ricos em florestas, com 13% da área florestal global, e com uma alta diversidade climática e geográfica, observando-se uma enorme variedade de patógenos associados à doenças de plantas (ROEL, 2001). Além disso, o autor salienta que a utilização comercial de espécies nativas, tanto para consumo interno como para exportação, acarreta em preocupação quando se refere ao controle de doenças em espécies florestais, sendo esse um desafio que persiste e tem se agravado anualmente.

A ocorrência de pragas e doenças tem se tornado um dos principais problemas que colocam em risco e comprometem a sustentabilidade das florestas, e a presença desses agentes bióticos danosos pode ser favorecida por dois fatores: a condição climática que possibilita a realização do ciclo biológico do patógeno ou praga, e a adoção de práticas silviculturais inadequadas, como a utilização de equipamentos contaminados (ASSIS, 2006).

Nesse sentido, existem poucos relatos acerca de doenças incidentes em espécies arbóreas tropicais. Além disso, o conhecimento dos patógenos que atacam as principais espécies florestais, o grau de severidade das doenças e as condições ambientais predisponentes para que as doenças ocorram são os primeiros passos para a definição de medidas de manejo, com a finalidade de minimizar prejuízos e promover o estabelecimento da árvore na floresta (ASSIS, 2006).

Para espécies florestais nativas ainda são escassos os relatos de ocorrência de doenças. Entretanto, tem-se observado a presença de fungos causadores de manchas foliares em diversas espécies, com destaque para *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae), conhecida popularmente como cedro. Trata-se de uma espécie rara, que se desenvolve no interior da floresta primária, regenerando-se principalmente em clareiras e com ampla dispersão na Região Sul e Sudeste do Brasil, possuindo rápido crescimento, produzindo madeira de excelente qualidade, o que tem causado intensa exploração pelos madeireiros (CARVALHO, 1994; REITZ et al., 1988).

Apesar da carência de pesquisas relacionadas à fitossanidade de espécies florestais nativas, tem sido relatada a ocorrência de fungos causadores de mancha foliar em *C. fissilis*. O gênero *Phoma* pertence à família Didymellaceae, caracterizado por ser cosmopolita, ocorrendo geralmente em plantas, podendo causar lesões foliares e no caule (AVESKAMP et al., 2008, 2010; CHEN et al., 2015a, b).

Boerema et al. (2004) afirmaram que o gênero *Phoma* se associa a quatro gêneros teleomorfos, entre eles *Didymella* spp. No entanto, Chen et al. (2017) afirmaram que essa classificação não se enquadrava quando as espécies eram analisadas molecularmente. Dessa forma, os autores realizaram uma ampla revisão taxonômica da família Didymellaceae com base em dados de sequência de DNA multi-locus e a espécie *Phoma pedeia* foi renomeado para *Didymella pedeia*.

Segundo os autores, esse estudo possibilitou avanços na compreensão sobre a distribuição e biodiversidade da família Didymellaceae, embora a renomeação de alguns gêneros ainda necessite de esclarecimentos. De acordo com Aveskamp et al. (2010), o gênero *Phoma* necessita de uma revisão abrangente, pois desempenha um papel importante na delimitação de gêneros fitopatologicamente relevantes.

Nesses últimos anos tem-se observado um aumento da preocupação da sociedade com relação à utilização de produtos químicos no combate a pragas e doenças que afetam o desenvolvimento de espécies florestais, e por vezes aumentando a resistência dos organismos aos pesticidas utilizados. Dessa forma, têm surgido métodos alternativos de controle de patógenos, como o uso de compostos secundários presentes no extrato bruto ou em óleo essencial (OE) de plantas medicinais e espécies florestais, podendo constituir em uma potencial forma de controle de doenças em plantas. Os OE oriundos do metabolismo vegetal, tem se tornado um dos mais promissores, sendo de fácil acesso para a pesquisa e consumidores.

Os OEs apresentam consistência viscosa e são definidos por um conjunto de propriedades, responsável pelos aromas, podendo ser de origem natural ou sintética (CARDOSO et al., 2000). Apresentam funções ecológicas, especialmente como inibição da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda de água de folhas e meristemas, aumento da temperatura e na remoção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) (CRAVEIRO;

MACHADO, 1986; HARBONE, 1993; GANG, 2005; GLINWOOD et al., 2011). De forma complementar, vários OEs se mostraram potenciais agentes defensores contra bactérias, fungos e infestantes (BAKKALI et al., 2008).

Nesse contexto, *C. fissilis* surge como uma espécie promissora, podendo gerar produtos madeireiros e não madeireiros. Com relação à atividade antimicrobiana de OE de cedro, Lago et al. (2004) avaliaram o efeito do OE no controle de bactérias em seres humanos, verificando que o óleo de folhas demonstrou atividade antibacteriana moderada possivelmente devido a presença de substâncias como  $\beta$ -cariofileno e bicyclogermacreno, descritas na literatura com potencial antimicrobiano.

Com base no exposto, o objetivo geral deste estudo foi a identificação e caracterização morfofisiológica e molecular de *Phoma* spp., associado à *Cedrela fissilis* Vell., e avaliar a atividade antifúngica do OE de *C. fissilis* no controle *in vitro* de *Phoma pedicelae*.

## 2 CAPITULO 1 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Phoma pedeiaae* (Aveskamp, Gruyter & Verkley) ASSOCIADO À *Cedrela fissilis* Vell.

### 2.1 Resumo

Em países como o Brasil, com elevada diversidade climática e geográfica, observa-se uma enorme variedade de patógenos associados à plantas. Nesse contexto, tem sido relatada a presença de fungos causadores de manchas foliares em *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae), conhecida popularmente como cedro, acarretando em alterações nos processos fisiológicos, desfolhamento prematuro da planta, podendo levar à diminuição do crescimento e à morte do indivíduo. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi a identificação e caracterização morfofisiológica e molecular de *Phoma* spp. associado à *C. fissilis*. Foram coletadas folhas de árvores adultas com sintomas da doença na região central do Rio Grande do Sul, e encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi (UFSM), para posterior isolamento do fungo. O material vegetal foi previamente desinfestado e transferido para caixas gerbox, permanecendo em sala climatizada a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por três dias. Após, o material vegetal foi observado em microscópio estereoscópico e ótico para a verificação da presença de estruturas do fungo, e, quando se faziam presentes, foram transferidas para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA. Após 14 dias de desenvolvimento, os isolados foram purificados por meio da técnica da cultura monospórica e transferidos para os meios BDA, CA e V8 para caracterização morfofisiológica e molecular. Na avaliação da patogenicidade foram preparadas suspensões de esporos de dois isolados e inoculados por aspersão em mudas de cedro. As características morfofisiológicas analisadas foram: crescimento micelial (CM), taxa de crescimento micelial (TCM), índice de velocidade de crescimento micelial (ICVM), esporulação, pigmentação das colônias e caracterização dos conídios. A partir da caracterização molecular, por meio do sequenciamento de genes das regiões ITS e  $\beta$ -tubulina, as sequências foram depositadas no GenBank e tiveram similaridade de 70 e 81%, respectivamente, com o fungo *Didymella pedeiaae*, forma sexuada de *Phoma pedeiaae*. Com a patogenicidade, foi possível observar somente a presença da forma assexuada (*P. pedeiaae*) e os sintomas tiveram início, aproximadamente, aos 20 dias após a inoculação, não diferindo entre os dois isolados, apresentando manchas amareladas nas bordas das folhas, seguido de coalescência e posterior necrose e desfolha das mudas, causando a morte dos indivíduos em, aproximadamente, 50 dias. Com relação à morfologia, o fungo apresentou picnídios arredondados, de coloração preta, micélio de coloração branca, conídios com comprimento de  $3,87 - 4,10 \mu\text{m}$  por  $2,07 - 2,85 \mu\text{m}$  de largura, com formato oval oblongo, sem septos e hialinos. A esporulação dos isolados no meio de cultura V8 foi superior aos demais meios ( $2,69 - 4,35 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ). Portanto, este é o primeiro relato do fungo *Phoma pedeiaae* em espécies florestais no Rio Grande do Sul, o qual demonstrou elevada agressividade.

**Palavras-chave:** Fungo. Mancha foliar. Cedro. PCR.

## 2.2 Introdução

O Brasil é um país que abrange uma grande diversidade biológica, encontrada nos diversos ecossistemas existentes, com numerosas formas de vida. No entanto, a utilização dos recursos florestais pelo homem, através dos tempos, tem provocado uma redução drástica das diversas comunidades vegetais, comprometendo a sustentabilidade e a posterior manutenção da diversidade biológica das florestas (NASCIMENTO et al., 2001).

A exploração intensiva de madeiras de grande valor econômico de espécies como *Cedrela fissilis* Vell. (cedro) tem reduzido suas reservas naturais, colocando essa população em grande perigo de extinção. Trata-se de uma espécie que possui ampla dispersão na Região Sul e Sudeste do Brasil (REITZ et al., 1988), desenvolvendo-se no interior da floresta primária, podendo ser agressiva na vegetação secundária (CARVALHO, 1994). A alta qualidade e o alto valor comercial da madeira de cedro, o torna alvo do extrativismo e da exploração indiscriminada, acarretando em derrubadas desproporcionais nas formações vegetais onde ocorre naturalmente (RUIZ FILHO et al., 2004). Ainda, Roel (2001) afirma que a produção de espécies florestais nativas para uso comercial tem gerado uma preocupação no que se refere ao manejo de doenças, sendo este, um desafio que persiste e está em contínuo agravamento.

Um dos principais problemas que comprometem a sustentabilidade das florestas é a ocorrência de pragas e doenças, que podem ser favorecidas pela condição climática e pela adoção de práticas silviculturais inadequadas (ASSIS, 2006). A união desses dois fatores pode ser fundamental na ocorrência de patógenos em espécies florestais, podendo atacar diversas partes da planta, como raízes frutos e folhas. Fungos causadores de manchas foliares podem causar sérios danos ao hospedeiro, como alterações nos processos fisiológicos, desfolhamento prematuro da planta, podendo levar à diminuição do crescimento e à morte do indivíduo (FERREIRA, 1989).

O fungo *Phoma pedeiaae* pertence à família Didymellaceae, caracterizada pela distribuição em diversos ambientes, ocorrendo geralmente em plantas, podendo atacar folhas e caule (AVESKAMP et al., 2008, 2010; CHEN et al., 2015 a, b). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi a identificação e caracterização morfofisiológica e molecular de *Phoma* sp., associada à *Cedrela fissilis* Vell.

## 2.3 Revisão Bibliográfica

### 2.3.1 A espécie *Cedrela fissilis* Vell.

A espécie *Cedrela fissilis* Vell., pertencente à família Meliaceae, conhecida popularmente como cedro, é uma árvore de 20 a 35 metros de altura e tronco de 60 a 90 cm de diâmetro, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, nas florestas semidecídua e pluvial atlântica (LORENZI, 1992). Trata-se de uma espécie rara, que se desenvolve no interior da floresta primária, regenerando-se principalmente em clareiras com áreas menores que 60 m<sup>2</sup>, porém é agressiva na vegetação secundária (CARVALHO, 1994). Possui ampla dispersão na Região Sul e Sudeste do Brasil, apresentando bom crescimento, produzindo madeira de excelente qualidade (REITZ et al., 1988).

A espécie apresenta elevada plasticidade dentro dos gradientes de luz, indicada para plantios sob intensidades luminosas reduzidas e a céu aberto, com excelente comportamento em ambas as situações, podendo ser considerada uma espécie apta para sistemas de enriquecimento florestal ou de recuperação de áreas degradadas (GUARIZ, 2006).

O metabolismo secundário de *C. fissilis*, que tem papel importante nas defesas vegetais contra a herbivoria e outras defesas inter-espécies, é caracterizado pela produção de terpenos, despertando interesses nas áreas industrial e medicinal (STAMP, 2003). A família Meliaceae é conhecida pela presença de substâncias chamadas limonoides, que têm amplo espectro de atividade biológica, em particular como inseticida (AMBROZIN et al, 2006). Carvalho (2003) descreve a casca dessa espécie como antisséptica, tônica, adstringente e contra leucorréias. Além disso, têm sido relatadas propriedades terapêuticas como antiviral, anti-helmíntica, antirreumática, anti-inflamatória, anticancerígeno, antimicobacteriana (NUNES et al., 2007).

### 2.3.2 Histórico de doenças foliares no gênero *Cedrela*

Segundo Assis (2006), um dos principais problemas que colocam em risco e comprometem a sustentabilidade das florestas é a ocorrência de pragas e doenças. Dessa forma, o autor salienta que a presença desses agentes bióticos danosos pode ser favorecida por dois fatores: a condição climática que possibilita a realização do ciclo biológico do patógeno ou praga e a adoção de práticas silviculturais inadequadas que disseminem esses organismos. Nesse sentido, existem poucos relatos acerca de doenças incidentes em espécies arbóreas tropicais, sendo que o conhecimento dos patógenos que atacam as principais espécies florestais, o grau de severidade das doenças e as condições ambientais predisponentes para que as doenças ocorram são os primeiros passos para a definição de medidas de manejo, com a finalidade de minimizar prejuízos e promover o estabelecimento da árvore na floresta.

Fungos patogênicos que causam manchas foliares podem causar sérios danos à planta hospedeira, principalmente alterações nos processos fisiológicos, como a fotossíntese e o desfolhamento prematuro da planta, podendo levar à diminuição do crescimento e à morte do hospedeiro (FERREIRA, 1989). Além disso, Bedendo (1995) salienta que as lesões provocadas por patógenos geralmente têm início com pequenos pontos cloróticos, podendo coalescer e provocar necrose de grandes áreas do limbo foliar, e a área central das lesões pode apresentar possíveis estruturas reprodutivas do fungo.

Com relação à *Cedrela fissilis*, foi observada a ocorrência do gênero *Phyllachora* associado à manchas foliares, com a presença de corpos de frutificação negros em áreas circulares, inicialmente com pequenas manchas cloróticas que aumentam, em tons de marrom-amarelado, distribuídas ao longo das folhas e pecíolos (FERREIRA, 1989; VIANA, 2012; ZACCARONI et al., 2013).

Lisboa et al. (2016) descreveram a incidência de *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not., fungo causador do cancro, apresentando conídios fusiformes a elípticos, sendo inicialmente hialinos, mas tornando-se castanho claro a marrom com o passar do tempo. As espécies do gênero *Botryosphaeria* possuem uma distribuição cosmopolita e causam sérios danos a várias culturas importantes, causando cancrios em árvores e arbustos (PHILLIPS et al., 2013).

No estado do Amazonas, foi relatada a presença do patógeno *Pseudobeltrania cedrelae* Henn, causando manchas foliares e desfolha em *C. odorata* Lumber. O patógeno caracteriza-se por apresentar pequenas pontuações marrons claras, em folhas novas, circundadas por halo clorótico, circulares a angulares, bordas bem definidas, apresentando pontuações negras no centro das lesões necróticas (HANADA et al., 2005).

Em um levantamento de doenças em viveiros, foi observada a presença do patógeno *Phomopsis* sp. em mudas de *C. odorata* (TRINDADE; COELHO NETTO, 2003). O patógeno apresenta sintomas com lesões necróticas arredondadas e tamanho variável, de cor marrom claro com fina borda marrom escura (CHARCHAR et al., 2003). Viana et al. (2012) também relataram a presença do fungo *Curvularia* sp. causando manchas foliares em indivíduos da mesma espécie. Os sintomas causados por esse patógeno são manchas arredondadas, de coloração marrom-avermelhada, ocorrendo a coalescência das manchas em casos severos, levando ao secamento das folhas (SANTOS et al., 2004).

### 2.3.3 O gênero *Phoma*

O gênero *Phoma* pertence à família Didymellaceae, com mais de 5400 nomes de taxon registrados no MycoBank (CROUS, 2004). A família foi criada por Gruyter (2009) para abranger três gêneros principais: *Ascochyta*, *Didymella* e *Phoma*, e recentemente, a taxonomia de Didymellaceae foi revisada com base em dados de sequência de DNA, melhorando significativamente a compreensão sobre a distribuição e biodiversidade dessa família (CHEN et al., 2017).

Grande parte das espécies do gênero *Phoma* é encontrada em associação com plantas terrestres, causando principalmente manchas foliares e manchas no caule (AVESKAMP et al., 2008; ZHANG et al., 2014). Cerca de 50% das espécies de *Phoma* spp. descritas por Boerema et al. (2004) são reconhecidas como fungos fitopatogênicos relevantes, incluindo uma série de agentes patogênicos com status de quarentena.

Tem se tornado consenso de muitos autores que a taxonomia de *Phoma* é confusa (RAI et al., 2014), possuindo mais de 200 espécies conhecidas, encontradas em todo o mundo. O gênero foi originalmente descrito por Saccardo em

1880 e revisado por Boerema e Bollen (1975), e, após mais de 40 anos de pesquisa taxonômica, as espécies de *Phoma* foram organizadas com base em um único ou apenas alguns caracteres morfológicos e não foram confirmados como biologicamente realistas por estudos de biologia molecular (BOEREMA, 1997; AVESKAMP et al., 2010; KÖVICS et al., 2013).

Recentemente, Chen et al. (2015a) e Chen et al. (2017) realizaram uma ampla revisão taxonômica da família Didymellaceae com base em dados de sequência de DNA multi-locus. Com base nestes estudos, a espécie *Phoma pedeia* foi renomeada para *Didymella pedeia*, sendo, portanto, sinônimos. Isso ocorreu devido ao gênero *Phoma* ser morfológicamente difícil de distinguir à morfologia sexual de *Didymella*. Dessa forma, o estudo foi realizado para esclarecer a delimitação genérica entre esses e outros gêneros pertencentes à família Didymellaceae.

Algumas espécies do gênero *Phoma*, na qual está classificada também a espécie *Phoma tarda* (Stewart) Boerema & Bollen, possuem *Didymella* spp. como fase sexuada, sendo consideradas heterotáticas (SALGADO et al., 2007). Os autores relataram a presença de *P. tarda* em cultivos de café (*Coffea arabica* L.) no Brasil, causando a seca de ponteiros e podridão no colo de mudas em viveiros, acarretando em prejuízos na produção. Ainda, tem sido relatada a ocorrência do patógeno *Phoma costarricensis* Echandi, causando sintomas em várias partes da planta (NOJOSA et al., 2009). De acordo com os autores, espécies desse gênero são caracterizadas por apresentar potencial de dano elevado sob condições ambientais propícias. Em cultivos de ervilha (*Pisum sativum* L.) tem sido relatada a presença do patógeno *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch, causando lesões em folhas e vagens, com aspecto arredondado ou irregular. Essa doença é favorecida por alta umidade relativa do ar e temperaturas inferiores a 23 °C (AGROLINK, 2018).

## 2.4 Material e Métodos

### 2.4.1 Obtenção do material vegetal

Foram coletadas folhas de árvores adultas com sintomas da doença em duas áreas, no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul (29° 43' 11.9" S e 53° 43' 01.9" W; 29° 42' 39.9" S e 53° 43' 02.9" W), durante o mês de outubro de 2016 (Figura 1). De acordo com a classificação de Alvares et al. (2013), o clima da região é subtropical úmido, tipo Cfa, caracterizado por apresentar temperatura média do mês mais frio entre -3 e 18 °C, e do mês mais quente superior a 22 °C, com precipitação média anual de 1.769 mm e chuvas bem distribuídas ao longo do ano.

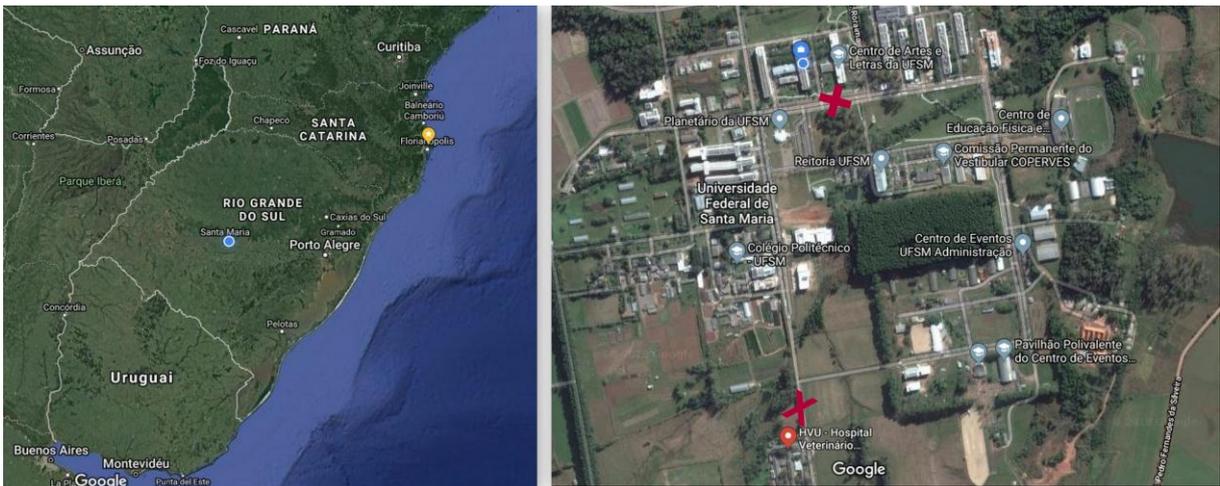


Figura 1. Município de Santa Maria, localizado na região Central do Rio Grande do Sul, onde foi realizada a coleta dos isolados de *Phoma* spp. (Fonte: Google Earth, 2018).

Após a coleta (Figura 2A), o material vegetal foi devidamente identificado e encaminhado ao Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais (UFSM), para posterior análise.



Figura 2. A) Coleta de folhas com sintomas da doença em *Cedrela fissilis* Vell., no município de Santa Maria; B) Isolamento do fungo; C) Folhas de *C. fissilis* com sintomas da doença causada por *Phoma* spp.

Para o isolamento do patógeno (Figura 2B), o material vegetal com sintomas da doença (Figura 2C) foi previamente desinfestado com hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% (v/v) por 1 min e lavado duas vezes em água destilada e autoclavada. Após esse procedimento, o material foi transferido para caixas gerbox (previamente desinfestadas com etanol 70% (v/v) por 30 s e hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 1 min), forradas com duas folhas de papel filtro esterilizadas no forno a 150°C, por 2 h, com adição de água destilada esterilizada.

O material foi incubado em sala climatizada a  $25 \pm 2$  °C até a formação das estruturas reprodutivas do fungo por, aproximadamente, três dias. Após esse procedimento, o material foi observado em microscópio estereoscópico e ótico. Quando estruturas fúngicas se faziam presentes, essas eram transferidas para placas de Petri de 80 mm de diâmetro, contendo meio de cultura Batata-dextrose-água (BDA) (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Após 14 dias de desenvolvimento do fungo, o mesmo foi purificado e realizada a cultura monospórica (FERNANDES, 1993), sendo posteriormente transferidos para os meios BDA, CA (cenoura-água) e V8 (suco de vegetais), com a

finalidade de verificar o meio de cultura adequado para o desenvolvimento do fungo, visto que não existem relatos na literatura que especifiquem o meio de cultura ideal para o seu crescimento.

#### 2.4.2 Patogenicidade dos isolados de *Phoma* spp.

A partir da cultura pura dos isolados de *Phoma* spp., obtido de folíolos de *C. fissilis*, conforme descrito no item 2.4.1, foi preparada uma suspensão de esporos. Os isolados foram cultivados em meio BDA a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, por 14 dias. Após foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa, e posterior raspagem do meio, e a suspensão obtida transferida para um béquer. A estimativa da concentração de esporos (esporos/mL) foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer, tendo a suspensão, no mínimo,  $1 \times 10^6$  esporos/mL, conforme sugerido por Alfenas e Mafia (2007). Dessa forma, adotou-se a concentração de  $6 \times 10^6$  esporos/mL, sendo ajustado por meio da equação:

$$V_f = V_i \times C_i / C_f,$$

Onde:

$V_f$  = volume final da suspensão;

$V_i$  = volume inicial da suspensão;

$C_i$  = concentração inicial de esporos/mL (quantificada na câmara de Neubauer);

$C_f$  = concentração de esporos/mL desejada.

##### 2.4.2.1 Inoculação

As mudas de *C. fissilis* foram obtidas por meio de semeadura em vasos de polipropileno (capacidade aproximada de 3L) contendo substrato comercial à base de turfa preta. A inoculação do fungo foi realizada nas mudas com, aproximadamente, oito meses de idade pelo método de aspersão nos isolados e o tratamento controle, com cinco repetições.

As plantas permaneceram em condições de câmara úmida por 48 horas (Figura 3A e 3B), com a finalidade de proporcionar condições ambientais favoráveis para a penetração do patógeno no tecido foliar do hospedeiro. O experimento foi realizado em casa de vegetação, sem controle da temperatura, com irrigação diária por 50 dias, quando ocorreu a morte da maioria dos indivíduos.

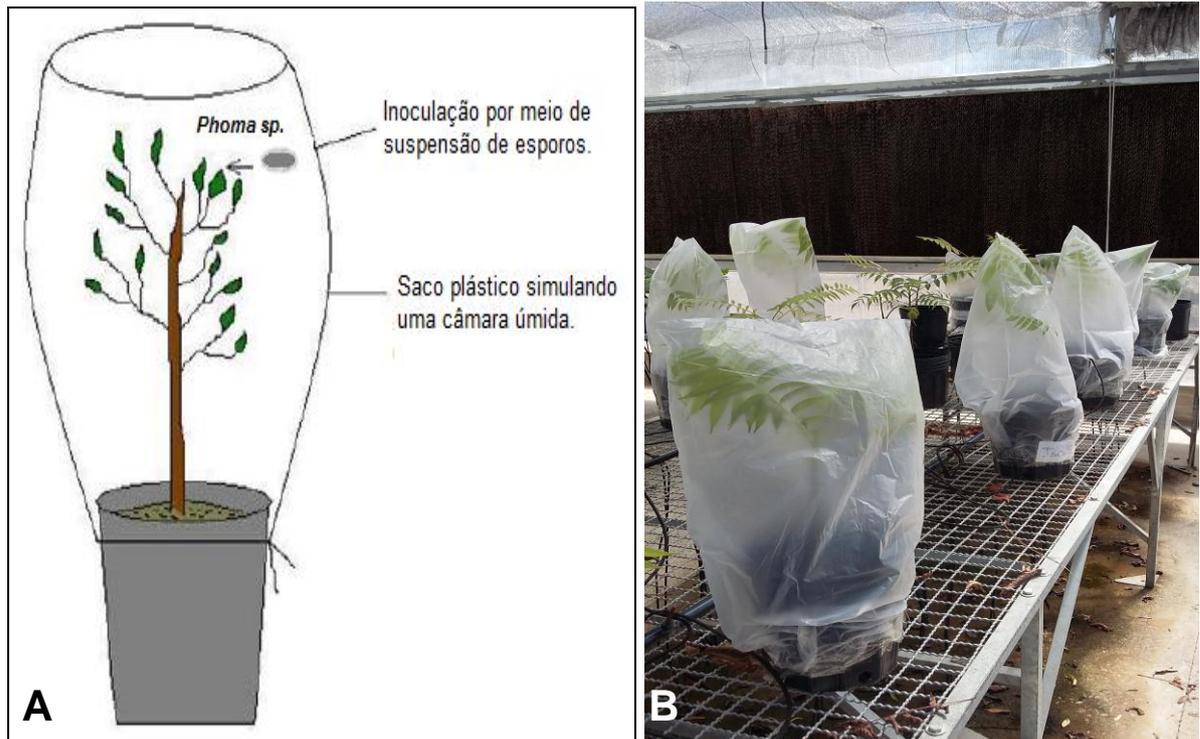


Figura 3. A) Modelo de câmara úmida, utilizada para inoculação do fungo *Phoma* spp.; B) Câmara úmida em vasos contendo mudas vivas de *Cedrela fissilis* Vell, instaladas em casa de vegetação. (Fonte: Adaptado de Alfenas; Mafia, 2007; Lazarotto, 2013; Dutra, 2017).

#### 2.4.2.2 Avaliação da patogenicidade

Após a inoculação do fungo nas folhas, foi observado o número de dias de incubação até que os primeiros sintomas estivessem aparentes (PARLEVLIET, 1979). A incidência da doença foi obtida de forma visual, a partir do acompanhamento diário dos sintomas, por um período de 50 dias. A patogenicidade foi classificada como positiva no caso de haver sintomas e como negativa, no caso de não ocorrer sintomas. A partir de um número padrão de folhas por muda, foi

realizada a quantificação da severidade, ou seja, em um total de seis folhas, foi observada a ocorrência ou não em cada uma dessas folhas.

#### 2.4.3 Caracterização morfofisiológica dos isolados patogênicos de *Phoma* spp.

As avaliações morfofisiológicas foram baseadas em metodologia descrita por Michereff et al. (2003), sendo que os dois isolados de *Phoma* spp. foram analisados pelos seguintes parâmetros: crescimento micelial (taxa de crescimento micelial - TCM e índice velocidade de crescimento micelial - IVCM), esporulação, pigmentação das colônias e caracterização dos conídios, que estão descritos abaixo.

##### 2.4.3.1 Crescimento micelial

O crescimento micelial (CM) foi determinado a partir da transferência de discos de meio BDA com 6 mm de diâmetro, obtidos de colônias puras, para outras placas com meio BDA. Para isso, foram utilizadas quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa. O CM de cada isolado foi avaliado diariamente até os 14 dias, por meio da mensuração da média do diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos. Com o CM foi possível a obtenção da TCM e IVCM, empregando-se a fórmula de Maguirre (1962) adaptado por Oliveira (1991).

$$TCM = Dn/n$$

Onde:

TCM = taxa de crescimento micelial;

Dn = diâmetro da colônia ao final da avaliação;

n = número de dias após a inoculação.

$$IVCM = \sum ((D - Da)/N)$$

Onde:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação.

#### 2.4.3.2 Esporulação

A esporulação foi avaliada aos 14 dias de incubação, pela adição de 10 mL de água destilada estéril em cada placa utilizada para avaliação do crescimento micelial, raspagem das colônias e peneiramento em camada dupla de gaze, para a posterior estimativa da concentração de esporos (esporos mL<sup>-1</sup>), com o auxílio da câmara de Neubauer, para os meios de cultura BDA, CA e V8.

Para avaliação da esporulação (bifatorial - isolados x meios de cultura) foi realizada a análise de variância, e a variável média foi comparada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, através do programa estatístico Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

#### 2.4.3.3 Pigmentação das colônias em meio de cultura

A pigmentação das colônias foi determinada nos meios de cultura BDA, CA e V8, e sua coloração foi identificada conforme a Munsell Soil Color Chart (2009).

#### 2.4.3.4 Caracterização dos conídios

Para a caracterização dos conídios, foi preparada uma suspensão de esporos do fungo em água destilada esterilizada (10 mL) e pipetada uma amostra sobre uma lâmina de microscopia para a observação. A largura e o comprimento foram medidos em microscópio ótico, com micrômetro acoplado, na magnitude de 40 x. Para cada isolado, foram medidos 40 esporos, sendo esse procedimento realizado para os dois isolados, cultivados em meio de cultura BDA.

#### 2.4.4 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de *Phoma* spp.

Os isolados de *Phoma* spp. selecionados e identificados foram encaminhados ao Instituto Biológico de São Paulo para a realização da extração de DNA e análise molecular do fungo. A extração do DNA foi baseada na metodologia descrita por Doyle e Doyle (1991) a partir do micélio crescido em meio de cultura BDA. A amostra de DNA genômico extraído foi submetida à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA. Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE et al., 1990). A reação para a PCR consistiu de 1 µL de DNA, 1 µL de cada primer a 10 µM, 10 µL de tampão para PCR 5X, 1 µL de dNTPs a 10 mM, 0,2 µL de GoTaq DNA polimerase 5U/µL (Promega) e 35,8 µL H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada, para um volume final de 50 µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C/2 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C/10 s, anelamento a 54 °C/30 s, extensão a 72 °C/45 s, e extensão final a 72 °C/4 min. A verificação dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ; RIESNER, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems).

Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). Sequências similares às obtidas para os isolados do presente estudo foram encontradas no GenBank através da ferramenta Blast e as que apresentaram os maiores *scores* foram selecionadas e alinhadas, juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo ClustalW. A análise filogenética foi conduzida utilizando o método estatístico *Neighbour-joining* com 1000 replicatas, pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007).

## 2.5 Resultados e Discussão

### 2.5.1 Isolados de *Phoma* spp.

A partir da observação da ocorrência do fungo *Phoma* spp. foram selecionados dois isolados para a realização das análises morfofisiológica e molecular, denominados como SM01 e SM02.

Os sintomas causados por *Phoma* spp. ocorrem em folhas, ramos, flores e frutos de plantas, e está amplamente distribuída em diferentes regiões do mundo. No Brasil, esse fungo foi identificado em 1973, no Estado do Espírito Santo (SALGADO et al., 2007), e algumas espécies desse gênero possui ocorrência limitada por fatores ambientais, tais como temperatura, umidade relativa do ar, intensidade luminosa e altitude (GOMEZ; BUSTAMANTE, 1977).

Estudos desse fungo em espécies florestais ainda são escassos, e ainda não existem relatos de ocorrência desse gênero em *C. fissilis*. Porém, a ocorrência desse gênero tem se tornado preocupante em outros tipos de cultivos, como o café (*Coffea arabica*), onde ocorre a presença da doença conhecida por Mancha de Phoma, que tem causado sérios danos ao cultivo (NOJOSA et al., 2009).

Esses autores ressaltaram que o fungo *Phoma* spp. pode ter um potencial de dano elevado sob condições ambientais propícias, geralmente elevada precipitação e umidade relativa do ar. Nesse contexto, Dias et al. (1999) ressaltaram que a ocorrência desse gênero é favorecida pela elevada umidade do solo, motivo este que pode ter facilitado a disseminação deste patógeno, visto que o período de coleta de material para isolamento fúngico foi caracterizado pela precipitação acima da média e elevada umidade relativa do ar, aproximadamente 400 mm e 90%, respectivamente (INMET, 2017).

### 2.5.2 Patogenicidade dos isolados de *Phoma* spp.

Os sintomas causados pelo fungo *Phoma pedicellae* iniciaram, aproximadamente, aos 20 dias após a inoculação por aspersão. Os isolados não apresentaram diferenças nos sintomas da doença, o que pode ser explicado pela

região de coleta do material vegetal ser de áreas próximas. Os sintomas caracterizaram-se por apresentar manchas amareladas nas bordas dos folíolos, seguido de coalescência e posterior necrose e desfolha das mudas (Tabela 1).

Tabela 1 - Patogenicidade de *Phoma* spp. em função da incidência de manchas necróticas em folhas de *Cedrela fissilis* Vell.

Isolado	Número médio de folhas atacadas	Patogenicidade	Incidência (%)	Severidade (%)
<b>SM01*</b>	4	Positiva	100	66,7
<b>SM02</b>	3	Positiva	100	50
<b>Testemunha</b>	0	Negativa	0	0

Em que: \*SM: Isolado Santa Maria.

Os isolados não apresentaram diferença com relação aos sintomas causados pelo fungo (Figura 4), diferindo da testemunha, a qual não apresentou sintomas. Tem sido relatada a ocorrência de *Phoma multirostrata* (P.N. Mathur, S.K. Menon & Thirum.) Dorenb. & Boerema, agente causal da Mancha de Phoma, em mudas de baru (*Dipteryx alata* Vogel), apresentando como sintomas lesões foliares marrons quatro dias após a inoculação (ANJOS et al., 2009).

Zheng et al. (2017) testaram a patogenicidade de três isolados de *P. Herbarum* Westend. em palmeira (*Elaeis guineenses* Jacq) na China e verificaram que, sete dias após a inoculação, as plantas começaram a apresentar sintomas visíveis da doença, como manchas marrons escuras redondas ou irregulares, com ou sem halo amarelo na borda, tornando-se oval ou de forma irregular.

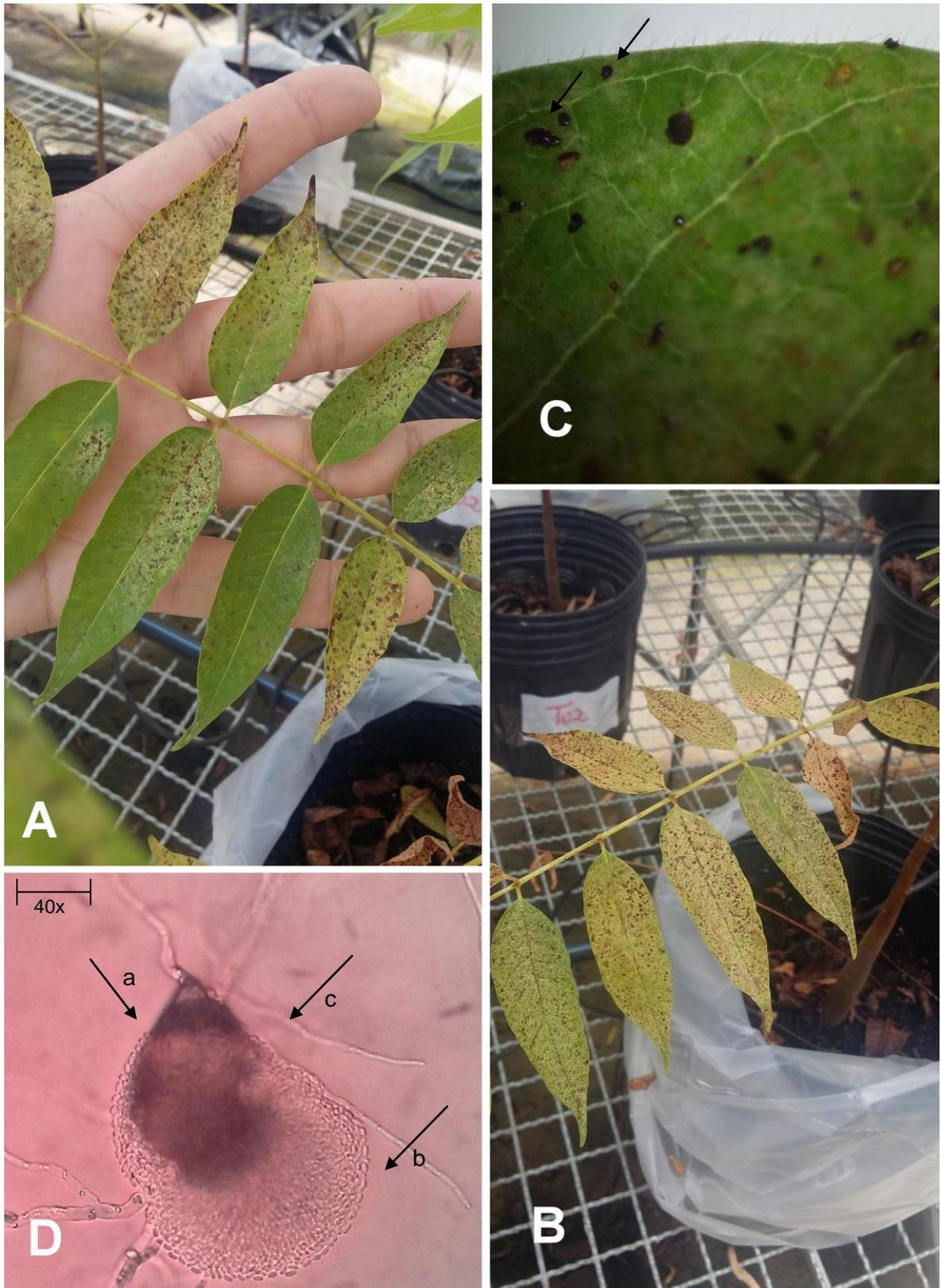


Figura 4. A e B) Sintomas causados por *Phoma* spp., em mudas de *Cedrela fissilis* Vell., aos 50 dias após a inoculação por aspersão. C) Sintomas de *Phoma* spp., observados em microscópio estereoscópico; D) Picnídio e conídios de *Phoma* spp, observados em microscópio ótico (40x) (a: picnídio; b: conídios; c: hifa).

### 2.5.3 Caracterização morfofisiológica dos isolados de *Phoma* spp.

Com relação à morfologia, a colônia do fungo apresentou pigmentação marrom avermelhado (2.5YR4/4) em meio BDA (MUNSELL, 2009), com micélio de coloração branca e picnídios arredondados, de coloração preta (Figura 5A e 5B). As características morfológicas relacionadas ao crescimento e à caracterização dos conídios estão apresentadas na Tabela 2, sendo possível observar que o crescimento micelial (CM), a taxa de crescimento micelial (TCM) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foram semelhantes para ambos os isolados, bem como o comprimento e a largura dos conídios.

Entre as formas dos esporos, observada em meio BDA, foi verificada a presença de conídios ovais oblongos, sem septos e hialinos, em ambos os isolados. Além disso, tanto o comprimento como a largura não apresentaram diferenças, variando de 4,100 a 3,875  $\mu\text{m}$  e 2,850 a 2,075  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Com relação ao crescimento micelial, que variou de 32 a 35 mm aos 14 dias, Salgado et al. (2007) verificaram valores semelhantes aos encontrados no presente estudo para as espécies *P. costarricensis* e *P. herbarum*, com diâmetro da colônia variando de 30 a 35 mm.

Tabela 2 – Características morfológicas dos isolados de *Phoma* spp. obtidas de plantas sintomáticas de *Cedrela fissilis* Vell.

Isolados	Esp. (.10 <sup>6</sup> )	CM (mm)	TCM (mm dia <sup>-1</sup> )	IVCM	Forma dos conídios	Conídios	
						Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )
<b>SM01</b>	6,52	35,02	2,50	6,82	Oval oblongo	4,100	2,850
<b>SM02</b>	6,45	32,80	2,34	4,31	Oval oblongo	3,875	2,075

Esp: Esporulação aos 14 dias; CM (mm): Crescimento micelial; TCM (mm dia<sup>-1</sup>): Taxa de crescimento micelial; IVCM (mm dia<sup>-1</sup>): Índice de velocidade de crescimento micelial.

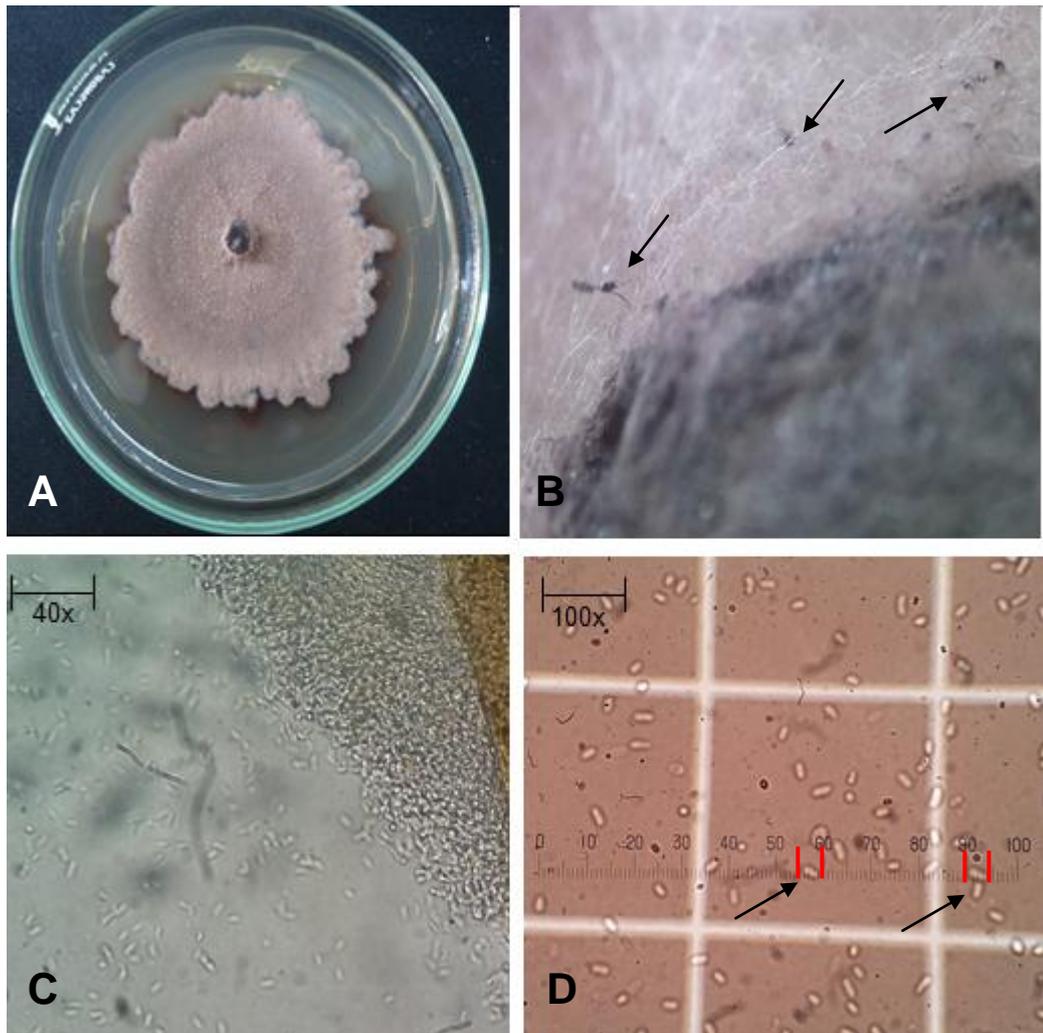


Figura 5. Caracterização morfológica de *Phoma* spp. A) Colônia pura de *Phoma* spp., em meio BDA; B) Presença de micélio aéreo branco e picnídios puntiformes negros observados em microscópio estereoscópico; C) Conídios obtidos de colônias puras, observados em microscópio ótico; D) Comprimento dos conídios, observados em microscópio ótico.

Zheng et al. (2017) observaram a presença de *Phoma herbarum* em palmeira (*Elaeis guineensis*), o qual apresentava conídios de formato oval e arredondado nas extremidades, com dimensões variando de 4,4 a 6,4  $\mu\text{m}$  por 1,5 a 2,4  $\mu\text{m}$ , sendo valores semelhantes aos encontrados no presente estudo.

No entanto, Salgado et al. (2007) relataram a presença de *P. costarricensis* e *P. herbarum* em plantios de café, e, ao realizarem a caracterização morfológica dos patógenos, observaram que ambos se diferenciavam morfológicamente. *P. costarricensis* apresentava conídios unicelulares fusiformes, hialinos, micélio de coloração branca e conídios de dimensões 3,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  por 2,0 a 2,5  $\mu\text{m}$ .

Entretanto, o patógeno *P. herbarum* apresentava conídios oblongos, de dimensões variando de 4,0 a 5,0 µm por 2,0 a 2,5 µm, demonstrando a variabilidade existente entre os conídios de espécies pertencentes ao mesmo gênero.

#### 2.5.4 Esporulação e pigmentação da colônia pura de *Phoma* spp. em diferentes meios de cultura

A esporulação dos isolados em diferentes meios de cultura está apresentada na Tabela 3, ocorrendo interação entre os isolados e os meios de cultura. Os isolados não diferiram entre si, apresentando esporulação semelhante em cada meio de cultura. No entanto, os meios BDA e CA não diferiram significativamente, apresentando diferenças quando comparados ao meio de cultura V8, que apresentou maior número de esporos para ambos os isolados.

Tabela 3 – Esporulação ( $\times 10^6$  esporos/mL) de *Phoma* spp. mensurada aos 14 dias em diferentes meios de cultura.

Isolado	Meios de cultura		
	BDA	V8	CA
SM01	1,04 aB	4,35 aA	1,15 aB
SM02	2,32 aB	2,69 aA	1,32 aB
C.V. (%)		24,87	

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância. Onde: BDA: batata-dextrose-ágar, V8: suco de vegetais, CA: meio de cultura composto por cenoura e ágar e C.V: coeficiente de variação.

A pigmentação das colônias foi distinta para cada meio de cultura, conforme Munsell (2009). A coloração de ambos os isolados no meio de cultura BDA foi marrom avermelhado (2.5Y4/4), enquanto os meios CA e V8 apresentaram coloração vermelho claro, 10R5/5.2 e 5R4/4/4, respectivamente (Figura 6).



Figura 6. Aspecto e coloração das colônias de *Phoma* spp. em meio BDA, CA e V8, após 14 dias de incubação. Visualização do lado superior (acima na figura) e inferior da placa de Petri (abaixo na figura).

#### 2.5.5 Caracterização molecular dos isolados patogênicos de *Phoma* spp.

Foi gerado um dendrograma filogenético para as regiões genômicas ITS (Tabela 4) e  $\beta$ -tubulina (Tabela 5), e abaixo são apresentados os acessos utilizados para a comparação filogenética de cada região, obtidas a partir do *GenBank*, seguidas de seu número de acesso, percentual de cobertura e similaridade. Para a construção do dendrograma, foram escolhidos acessos com maior similaridade e cobertura da sequência, obtidos após o alinhamento (Figura 7 e Figura 8).

Tabela 4 – Acesso no *GenBank*, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS.

Espécies	Acesso no <i>GenBank</i>	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referências
<i>Didymella pedeiaie</i>	KM 507779	98	99	Bohl Stricker et al. (2015)*
<i>Didymella pedeiaie</i>	NR 135984	91	99	Aveskamp et al. (2015)
<i>Phoma moricola</i>	KX 065025	98	99	Li et al. (2016)
<i>Phoma sojicola</i>	FJ 418182	98	97	Chadha et al. (2008)
<i>Phoma bellidis</i>	JX 406536	95	98	Tang et al. (2012)
<i>Phoma pedeiaie</i>	KT 309923	91	99	Johnston e Park (2015)
<i>Didymella glomerata</i>	KT 827261	81	95	Soares e White (2016)*
<i>Didymella bellidis</i>	KX 302080	81	93	Xiang et al. (2016)
<i>Ascochyta fabae</i>	FM 180026	84	94	Sherieff (2008)
<i>Ascochyta fabae</i>	FM 180027	84	94	Sherieff (2008)

\*Acesso lançado no *GenBank*, porém, ainda não publicado.

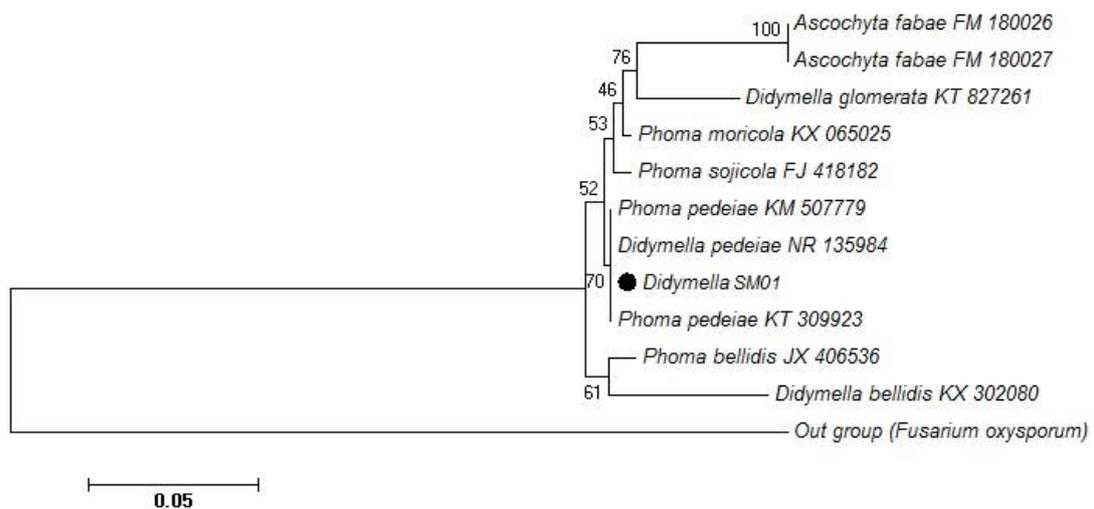


Figura 7. Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas.

Tabela 5 – Acesso no *GenBank*, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica  $\beta$ -tubulina.

Espécies	Acesso no <i>GenBank</i>	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referências
<i>Didymella pedeiae</i>	GU 237641	89	97	Aveskamp et al. (2010)*
<i>Didymella pedeiae</i>	GU 237642	89	97	Aveskamp et al. (2010)
<i>Didymella glomerata</i>	LT 592974	98	99	Valenzuela-Lopes et al. (2017)
<i>Phoma pinodella</i>	AY 831511	78	93	Ellwood et al. (2006)
<i>Didymella microchlamydospora</i>	KX 821247	89	96	Ahmadpour et al. (2017)
<i>Didymella microchlamydospora</i>	KX 821246	92	96	Ahmadpour et al. (2017)
<i>Didymella microchlamydospora</i>	KX 821245	92	96	Ahmadpour et al. (2017)
<i>Phoma sorghina</i>	FJ 427174	86	94	Aveskamp et al. (2009)
<i>Phoma bellidis</i>	KR 818909	91	99	Xu (2015)
<i>Didymella bellidis</i>	MF 065776	83	94	Gomzhina et al (2017)

\*Acesso lançado no *GenBank*, porém, ainda não publicado.

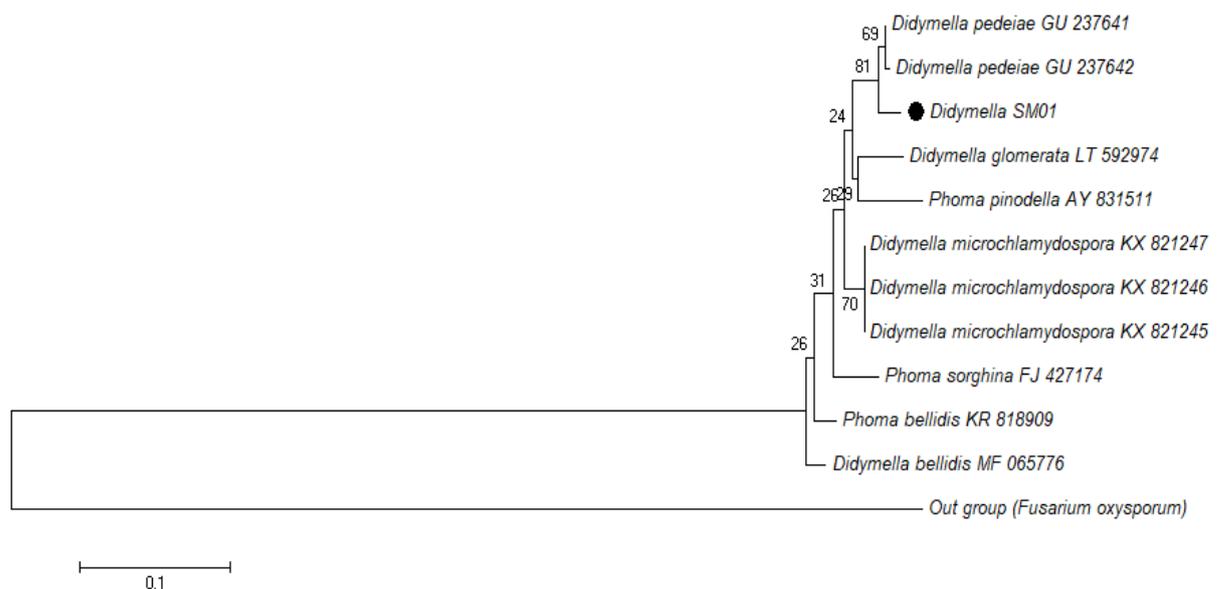


Figura 8. Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região  $\beta$ -tubulina. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas.

Com o sequenciamento das regiões ITS e  $\beta$ -tubulina foi possível definir a espécie em questão, como pertencente ao clado de *Phoma pedeiaae* (KT 309923) e *Didymella pedeiaae* (KM 507779; NR 135984; GU 237641; GU 237642). O isolado de *P. pedeiaae* do presente estudo pertence ao mesmo *clade* (ramo) que as espécies *P. pedeiaae* e *D. pedeiaae*, apresentando uma alta similaridade (99 a 93%), e o suporte de *bootstrap* foi de 70% e 81%, respectivamente.

Dessa forma, o isolado *Didymella SM01* foi identificado como *Didymella pedeiaae*, forma sexual de *Phoma pedeiaae*, pertencente à família Didymellaceae. O gênero *Didymella* spp. ainda não foi descrito para *C. fissilis* e não existem ocorrências para espécies florestais. Segundo Aveskamp et al. (2010), esse gênero necessita de uma revisão abrangente, pois desempenha um papel importante na delimitação de gêneros fitopatologicamente importantes.

## 2.6 Conclusões

- Este é o primeiro relato do fungo *Phoma pedeiaae* em *Cedrela fissilis* no Rio Grande do Sul, o qual demonstrou ser patogênico.

- O fungo *Phoma pedeiaae* apresenta crescimento e esporulação superior em meio de cultura composto por suco de vegetais e ágar (V8).

### 3 CAPITULO 2 – OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cedrela fissilis* Vell.

#### 3.1 Resumo

Os óleos essenciais (OEs) são produtos obtidos de tecidos de plantas, possuindo funções ecológicas, como promotores de crescimento, proteção contra predadores, atração de polinizadores, entre outras funções. A espécie *Cedrela fissilis* Vell. produz madeira de excelente qualidade com ampla dispersão na Região Sul e Sudeste do Brasil, desenvolvendo-se no interior da floresta primária. Em contrapartida, tem sido relatada a presença de fungos causadores de manchas foliares em diversas espécies florestais nativas, entre elas a *C. fissilis*, porém, medidas de controle ainda são inexistentes para essa espécie. Com isso, têm surgido métodos alternativos no controle dessas doenças, como o uso de OE de espécies florestais. O objetivo do trabalho foi identificar e caracterizar a composição do OE de folíolos de *C. fissilis*, coletados na estação primaveril dos anos de 2015, 2016 e 2017, e analisar a atividade antifúngica de diferentes concentrações do OE no controle do patógeno *Phoma pedicariae*. O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Extrativos Vegetais e de Fitopatologia Elocy Minussi (UFMS), sendo extraído o OE de folíolos jovens de *C. fissilis* (Santa Maria, RS). A extração do OE foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado por 3 h, em triplicata. A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do OE dos folíolos de *C. fissilis* foi a partir de colônias puras de *P. pedicariae*, repicadas em discos de 9 mm e transferidos para placas de Petri de 90 mm de diâmetro, previamente esterilizadas, contendo 30 mL de meio de cultura BDA, suplementado com o OE previamente diluído em etanol, nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , além de controle positivo e negativo, e incubadas em BOD a 25 °C, com 12h de fotoperíodo e medições diárias do diâmetro da colônia. As variáveis analisadas foram crescimento micelial (CM), taxa de crescimento micelial (TCM), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e inibição de crescimento micelial (ICM), em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, tendo as concentrações como fatores de variação. Ao final dos três anos de avaliação foram identificados 45 componentes do OE de folíolos de *C. fissilis*, correspondendo a, aproximadamente, 90% da composição total do OE nos três anos de coleta, com a predominância das substâncias  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -cubebeno, viridiflorol, espatulenol, elixeno e germacreno D. O OE apresentou atividade fungistática relativa frente a *P. pedicariae* a partir da concentração de 0,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , com uma ICM de 43,5%, sendo que a inibição foi superior com o aumento da concentração. Dessa forma, o óleo essencial de folíolos de *Cedrela fissilis* é indicado para uso no controle de patógenos, por se tratar de um metabólito secundário de origem vegetal, não causando prejuízos ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** Essências florestais. Controle de doenças. Cedro. *Phoma* sp.

### 3.2 Introdução

Em um país com dimensões territoriais como o Brasil, com alta diversidade climática e geográfica, observa-se uma enorme variedade de patógenos associados a plantas. Além disso, a utilização comercial de espécies nativas, tanto para consumo interno como para exportação, acarreta em preocupação quando se refere ao controle de doenças em espécies florestais, sendo esse, um desafio que persiste e tem se agravado anualmente (ROEL, 2001).

Tem sido relatada a presença de fungos causadores de manchas foliares em diversas espécies florestais nativas, com destaque para a *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae), conhecida popularmente como cedro. Trata-se de uma espécie rara, que se desenvolve no interior da floresta primária, regenerando-se principalmente em clareiras, porém é agressiva na vegetação secundária (CARVALHO, 1994). A espécie apresenta bom crescimento, produzindo madeira de excelente qualidade, possuindo ampla dispersão na Região Sul e Sudeste do Brasil (REITZ et al., 1988).

Segundo Carvalho (1994), entre as madeiras leves, o cedro é a que possibilita o uso mais diversificado, superado somente pela madeira de *Araucaria angustifolia*. Ruiz Filho et al. (2004) relataram que a alta qualidade e o alto valor comercial da madeira de cedro a tem tornado alvo do extrativismo e da exploração indiscriminada, acarretando em derrubadas desproporcionais nas formações vegetais onde ocorre naturalmente.

No entanto, algumas doenças que causam mancha foliar tem sido observadas para essa espécie, fazendo com que, a partir da incidência do patógeno, a planta diminua o seu aparato fotossintético, acarretando em perdas na produção de madeira. No entanto, não existem produtos químicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA para utilização na espécie em estudo, e os produtos que ilegalmente possam ser utilizados podem afetar o seu desenvolvimento, e, por vezes, aumentar a resistência dos organismos aos produtos químicos utilizados.

Alguns patógenos causadores de manchas foliares têm sido relatados em espécies florestais causando redução da área fotossintética da planta, como a doença causada pelo gênero *Phoma*, que tem como principais sintomas a desfolha de árvores, necrose de ramos e rosetas, podendo resultar na queda indireta das flores, podridão seca de ponteiros e extremidade dos ramos, resultando em perdas

significativas (POZZA et al., 2001), podendo ocorrer desde a formação de mudas, no viveiro, até a fase de produção da cultura (LIMA et al., 2010).

Dessa forma, têm surgido métodos alternativos de controle de patógenos causadores de mancha foliar, como por exemplo, o uso de compostos secundários, como o óleo essencial (OE) de plantas medicinais e espécies florestais, podendo constituir uma potencial forma de controle de doenças em plantas. Esse produto, oriundo do metabolismo vegetal, tem se tornado um dos mais promissores, sendo de fácil acesso para a pesquisa e consumidores.

Os OEs apresentam consistência viscosa e são definidos por um conjunto de propriedades, responsável pelos aromas, podendo ser de origem natural ou sintética (CARDOSO et al., 2000), geralmente produzidos por estruturas secretoras especializadas, como glândulas, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas específicas, podendo essas ser encontradas em flores, folhas, frutos, madeira, casca, raízes, rizomas e sementes (SIMÕES; SPITZER, 2004). Do ponto de vista químico, OE é uma mistura heterogênea e complexa, podendo ser constituído por 50 a 300 substâncias de classes químicas diferentes, entre elas terpenoides (mono, sesquiterpenos e diterpenos), lignoides (alil e propenil derivados), hidrocarbonetos, fenóis, ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos (MAIA et al., 1998).

Os OEs apresentam funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda de água de folhas e meristemas, aumento da temperatura, remoção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e potenciais agentes defensores contra bactérias, fungos e infestantes (BAKKALI et al., 2008; CRAVEIRO; MACHADO, 1986; HARBONE, 1993; GANG, 2005; GLINWOOD et al., 2011). Entretanto, determinados fatores influenciam a composição desses metabólitos secundários, como a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, e até mesmo a indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETTO; LOPES, 2007).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar a composição do óleo essencial de folíolos de *Cedrela fissilis* Vell., coletados na estação primaveril dos anos de 2015, 2016 e 2017, e analisar a atividade antifúngica de diferentes concentrações do óleo essencial de *C. fissilis* no controle *in vitro* do patógeno *Phoma pedeiaae*.

### 3.3 Revisão Bibliográfica

#### 3.3.1 Definição de óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) já foram considerados como um “desperdício fisiológico”, ou ainda como resíduo do metabolismo das plantas (SIMÕES; SPITZER, 2004; GANG, 2005). No entanto, após inúmeras pesquisas relacionadas a esse produto obtido das plantas, autores salientaram que o OE está entre os produtos do metabolismo vegetal mais promissor e de mais fácil acesso para a pesquisa de compostos úteis ao homem e aos animais (DA SILVA et al., 2017).

Os OEs também são conhecidos por óleos voláteis, óleos etéreos ou simplesmente essências, e são definidos pela International Standard Organization (ISO/DIS9235, 2013) como produtos obtidos de partes de plantas por meio das técnicas de prensagem ou expressão, enfloração (enfleurage), extração assistida por micro-ondas, extração com solventes orgânicos, com fluído supercrítico, arraste a vapor d'água e hidrodestilação (VITTI; BRITO, 2003; SIMÕES; SPITZER, 2004; BAKKALI et al., 2008; ZHANG et al., 2011), de acordo com as características de cada espécie vegetal.

Os OEs são caracterizados por cheiro aromático, geralmente de cor incandescente a ligeiramente amarelada e insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos (NAZZARO et al., 2013). No entanto, a composição do OE varia conforme a espécie vegetal, origem geográfica da planta, condições climáticas, tipo de solo, fase do ciclo vegetativo e parte da planta que foi utilizada para a extração (ANGIONI et al., 2006; MASOTTI et al., 2003). Além disso, geralmente são secretados como metabólitos secundários com papel importante na polinização ou mecanismos de defesa contra bactérias e fungos (TAJKARIMI et al., 2010).

Segundo alguns pesquisadores, grande parte dos OEs possuem propriedades antimicrobianas contra uma ampla gama de micro-organismos, sendo relatados em vários estudos (JEONG et al., 2014; LEE et al., 2010; SMITH-PALMER et al., 2001), com características de importância frente aos micro-organismos, como a hidrofobicidade dos seus componentes, que passam facilmente pela membrana celular do patógeno interferindo nos mecanismos de transporte molecular levando à inativação celular (BURT, 2004; GOÑI et al., 2009).

Dessa forma, a caracterização do OE de plantas, principalmente no intuito de analisar as propriedades biológicas dos OE, como sendo antimicrobiano, antiviral, antimutagênico, anticancerígeno, antioxidante, anti-inflamatório e antifúngico tem se tornado objetivo de estudo (BAKKALI et al., 2008). Segundo Djilani e Dicko (2012) a produção e o consumo de OEs estão aumentando em todo o mundo, com importância também do ponto de vista econômico.

### 3.3.2 Funções ecológicas dos óleos essenciais nas plantas

Nos últimos anos têm-se observado a importância que os OEs exercem nos vegetais, muitas vezes com funções específicas, sendo vitais para a manutenção da espécie (DA SILVA, 2017). Os OEs apresentam diversas funções ecológicas, como potenciais agentes defensores contra bactérias, fungos e plantas infestantes (BAKKALI et al., 2008). A característica de volatilidade das substâncias garante às plantas um meio de comunicação e sinalização química (CARDOSO et al., 2000), importante nas interações planta-planta e planta-inseto (GLINWOOD et al., 2011).

Existem alguns fatores que afetam a composição química dos OEs, podendo torná-los potenciais para determinado fim, como a variação genética, nutrição, aplicação de fertilizantes, localização geográfica, clima da região, variações sazonais, estresse durante o crescimento ou maturidade e a secagem e armazenamento pós-colheita (CROTEAU, 1986; ALVAREZ-CASTELLANOS; PASCUAL-VILLALOBOS, 2003; HUSSAIN et al., 2008).

Ainda, as diferentes partes da planta também interferem na sua constituição e rendimento, ou seja, flores, folhas, hastes, raízes, frutas vão gerar diferentes composições, com propriedades biológicas e medicinais. Além disso, na maioria das vezes, a atividade biológica do OE é decidida pela união de dois ou mais componentes principais, tais como fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, éteres ou hidrocarbonetos (BAKKALI et al., 2008; RUSSO et al., 2015; BAYALA et al., 2014), ou pela combinação de moléculas que modificam a atividade para exercer um efeito significativo (ISMAN et al., 2008) e, ainda, a atividade antimicrobiana dos OEs pode ser completamente associada aos seus constituintes ativos (HYLDGAARD et al., 2012).

De maneira geral, Sharifi-Rad et al. (2017) elaboraram as possíveis funções dos OEs, como a alelopatia, a adaptação a estresses abióticos, a sinalização intra-plantas, a sinalização inter-planta, a defesa direta contra herbívoros e patógenos e a defesa indireta (indutíveis). Iriti e Faoro (2009) ainda ressaltaram que compostos voláteis, como os OE, também podem repelir organismos patogênicos, incluindo vírus e vetores de fitoplasma, enquanto que as fitoalexinas são metabólitos antimicrobianos de largo espectro.

Sharifi-Rad et al. (2017) realizaram um profundo estudo sobre as atividades biológicas dos OEs e elucidaram sobre os seus possíveis mecanismos de ação (Figura 9), sendo que muitos OEs possuem capacidade citotóxica satisfatória. Esses autores relataram que os principais mecanismos que intercedem os efeitos citotóxicos dos OEs incluem a indução da morte celular pela ativação de processos de apoptose e/ou necrose, bloqueio do ciclo celular e perda da função das organelas essenciais, além de poderem atuar como antioxidantes.

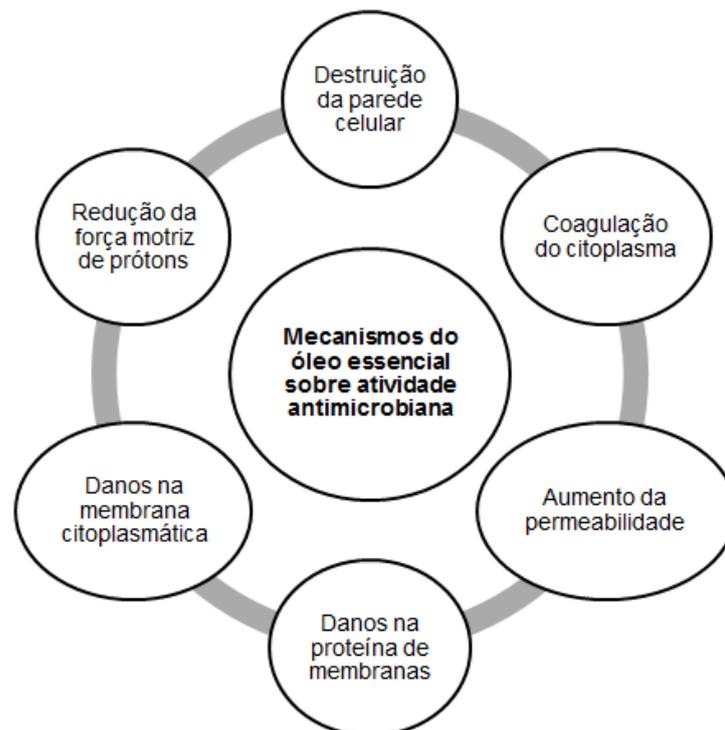


Figura 9. Mecanismos que os óleos essenciais apresentam em relação a atividade antimicrobiana (Adaptado de Khorshidian et al., 2018).

A atividade antimicrobiana pode se referir ao caráter hidrofílico ou lipofílico dos componentes dos OEs, do tipo de micro-organismo e da estrutura da parede

celular, sendo que as partes principais dos OEs são hidrofóbicas. Assim, interagem com a membrana celular e passam facilmente através do citoplasma (KHORSHIDIAN et al., 2018). Os autores ressaltam que a natureza lipofílica do esqueleto de hidrocarbonetos e a natureza hidrofílica dos grupos funcionais de OEs desempenham papéis substanciais nos efeitos antimicrobianos desses compostos.

A maior atividade antimicrobiana em OEs é encontrada com compostos fenólicos, seguindo em ordem por aldeídos, cetonas, álcoois, éteres e hidrocarbonetos (KALEMBA; KUNICKA, 2003). A atividade dos fenóis é atribuída à característica ácida do grupo hidroxilo. Esses compostos alteram a permeabilidade celular, agindo nas enzimas envolvidas na produção de energia e interrompendo a força motora de prótons, que, eventualmente, leva à morte celular (BASIM et al., 2000).

As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, muitos dos quais desempenham um papel na proteção contra predadores e patógenos que causam doenças. Os efeitos citotóxicos dos OEs tem sido principalmente por meio da interrupção das membranas, levando à permeabilização das células bacterianas, acarretando no comprometimento de outras funções celulares, como a atividade de bombear o fluxo e a atividade respiratória (O'BRYAN et al., 2015; ULTEE et al., 2002; NGUEFACK et al., 2004). Dessa forma, a capacidade de manter o potencial da membrana e o gradiente de pH é fundamental para a sobrevivência celular e a diminuição desses parâmetros é indicativo de danos significativos para a membrana celular (OHMIZO et al., 2004).

Ainda, produtos naturais com propriedades antifúngicas também são uma nova alternativa terapêutica, como por exemplo, na substituição do controle químico. Os OEs tem se tornado mais importantes pelo fato de que, bactérias e fungos estão cada vez mais resistentes a produtos químicos (BAJWA; KULSHRESTHA, 2013). Por outro lado, os OEs de plantas também podem ser usados como controle alternativo de endo e ectoparasitas (SHARIFI-RAD et al., 2017). Dessa forma, a atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial de plantas podem se constituir em uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas (SCHWAN-ESTRADA, 2009).

### 3.3.3 Óleo essencial de *Cedrela fissilis* Vell.

A família Meliaceae, pertencente à Ordem Sapindales, é composta por mais de 51 gêneros de plantas e 550 espécies (LOVATTO et al., 2012), com ampla distribuição geográfica (CARVALHO, 1994). No Brasil, os gêneros mais comuns que ocorrem naturalmente são *Cedrela*, *Cabralea* e *Toona* (WHITE et al., 2002).

As espécies da família Meliaceae são reconhecidas por fornecerem madeira de grande valor comercial, além de possuírem destaque na produção de limonoides, por meio dos metabólitos secundários (BANERJI; NIGAM, 1983). Segundo Matos et al. (2006), as meliáceas são caracterizadas quimicamente pela presença desses limonoides, que são derivados de triterpenos tetracíclicos, onde ocorrem diversas oxidações e rearranjos, levando à formação de diferentes estruturas. Os limonoides representam o nível máximo na sequência de produção de terpenoides em plantas que normalmente não são atacadas por parasitas, exercendo a função de proteção às plantas que os produzem.

Alguns autores relataram os limonoides como terpenoides superiores, relacionando a atividades de proteção nas plantas, como a inibição do crescimento de micro-organismos, bem como danos na maturação e redução da capacidade reprodutiva, podendo levar esses parasitas à morte por inanição ou toxicidade direta (VIEIRA; FERNANDES, 1999; GODFREY, 1994; HARBORNE, 1993).

Nesse contexto, a espécie *Cedrela fissilis* Vell. surge como uma alternativa promissora, podendo gerar produtos madeireiros e não madeireiros. Leite et al. (2008) afirmaram que essa espécie possui compostos ativos para o controle da doença de Chagas, por ter demonstrado efeito tripanocida. Entretanto, estudos relacionados às atividades biológicas do OE dessa espécie ainda são escassos. A literatura traz artigos referentes a outras espécies desse gênero, como a *Cedrela odorata*, que possui seu OE empregado para diversos fins, como uso medicinal, na indústria de perfumaria, sendo utilizado para produção de sabão, desinfetantes e purificadores de ar (ASEKUN; EKUNDAYO, 1999).

### 3.3.4 O gênero *Phoma* spp.

O estudo de doenças causadas pelo patógeno *Phoma* spp. é de extrema importância, visto que esse fungo é um dos agentes causais de doenças que causam mancha foliar. Alguns cultivos de importância econômica têm relatado a presença de patógenos do gênero *Phoma* ocorrendo desde a formação de mudas, no viveiro, até a fase de produção da cultura (LIMA et al., 2010).

*Phoma* pertence à família Didymellaceae, que possui mais de 5400 nomes de taxon registrados no MycoBank (CROUS, 2004), e foi criada por Gruyter (2009) para abranger três gêneros principais: *Ascochyta*, *Didymella* e *Phoma*. Trata-se de um gênero cosmopolita, ou seja, distribuída em uma ampla gama de ambientes, sendo geralmente patógenos de plantas, ocorrendo em diversos hospedeiros, causando lesões foliares e no caule (AVESKAMP et al., 2008, 2010, CHEN et al., 2015a, b).

A doença causada por *Phoma* spp. tem como principais sintomas a desfolha de árvores, queda de botões florais em decorrência da necrose, nos ramos ou nas rosetas, podendo resultar na queda indireta das flores, podridão seca de ponteiros e de extremidade dos ramos, resultando em perdas significativas (POZZA et al., 2001). Esse fungo tem sido relatado com frequência em plantios de café (*Coffea arabica*), com a ocorrência de *P. tarda*, *P. costarricensis* e *P. herbarum*, causando sintomas em várias partes da planta (NOJOSA et al., 2009; SALGADO et al., 2007).

### 3.4 Material e Métodos

#### 3.4.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial de *Cedrela fissilis* Vell.

##### 3.4.1.1 Material vegetal e seu preparo para extração

O material vegetal utilizado para o estudo consistiu de folíolos frescos, provenientes de árvores adultas da espécie *Cedrela fissilis* Vell., coletados no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, nos anos de 2015, 2016 e 2017.

Após a coleta (Figura 10A), o material foi encaminhado para o Laboratório de Fitopatologia para que fosse realizada a separação do material (folíolos destacados das folhas e hastes). Posteriormente, o material sadio e fresco foi levado ao Laboratório de Extrativos Vegetais, onde ocorreu a extração do óleo essencial.

No Laboratório de Extrativos Vegetais, os folíolos de *C. fissilis* foram reduzidos em amostras menores, com o auxílio de uma tesoura de poda e de um multiprocessador, e foram pesados, com o auxílio de uma balança analítica (Figura 10B e 10C).

##### 3.4.1.2 Obtenção do óleo essencial

A extração do óleo essencial de folíolos de *Cedrela fissilis* Vell. foi realizada pelo método de hidrodestilação (Figura 10D), utilizando o aparelho de Clevenger modificado (BRASIL, 2010) por 3 h, em triplicata. Após a extração, o OE teve seu volume determinado para cálculo do rendimento em relação ao material vegetal fresco e seco (somente folíolos) (% v/m), e armazenado em frasco de vidro vedado e conservado à - 4 °C até o momento da análise da sua composição.



Figura 10. A) Coleta de folhas de *Cedrela fissilis* Vell.; B) Separação entre folíolos e hastes, e redução com o auxílio de uma tesoura de poda; C) Folíolos após passar pelo multiprocessador; D) Extração do óleo essencial por meio do método de hidrodestilação.

#### 3.4.1.3 Rendimento e identificação da composição do óleo essencial

O rendimento do OE foi obtido diretamente a partir da sua massa, que foi pesada com o auxílio de uma balança analítica. A caracterização do OE ocorreu utilizando um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas (GC-EM) Agilent 5975C. A coluna capilar utilizada foi HP5-MS (Hewlett Packard, 5% fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25  $\mu\text{m}$ ), e a energia de ionização utilizada no espectrômetro de massas foi de 70 eV. Os

parâmetros escolhidos para a análise foram: Hélio como gás carreador; *split inlet* 1:100; programa de temperatura utilizado: 40 °C por 4 min; 40 a 320 °C a 4 °C min<sup>-1</sup>; fluxo 1 mL min<sup>-1</sup>; temperaturas utilizadas para injeção e detecção: 250 °C.

O procedimento para identificação dos constituintes do OE ocorreu por comparação dos índices de retenção, determinados pela utilização de uma curva de calibração de n-alcenos injetados nas condições mencionadas anteriormente para as amostras e padrões de fragmentação dos espectros de massas com a literatura de Adams (2009) e o banco de dados NIST (2010).

A análise quantitativa dos componentes químicos do extrativo foi obtida por cromatografia com detector de ionização de chamas (CG-DIC) em equipamento Agilent 7890A. Os critérios estabelecidos para as análises foram os mesmos mencionados para análise por CG-EM, considerando o modo *split inlet* 1:50, e utilizando a temperatura de 300 °C para injeção e detecção.

#### 3.4.2 Atividade antifúngica do óleo essencial de folíolos de *Cedrela fissilis* Vell. no controle *in vitro* de *Phoma pedeciae*

A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial dos folíolos de *C. fissilis* foi realizada a partir do *pool* dos OEs obtidos na extração dos anos de 2015, 2016 e 2017. O experimento foi realizado em duas fases. A primeira fase consistiu no teste da concentração de 1,0 µL mL<sup>-1</sup> de OE, que teve a finalidade de verificar a inibição ou não do patógeno com essa concentração.

A partir de colônias puras do patógeno, foram repicados discos de 9 mm e transferidos para placas de Petri de 90 mm de diâmetro previamente esterilizadas, contendo 30 mL de meio de cultura BDA, suplementado com o OE previamente diluído em etanol, na concentração de 1,0 µL mL<sup>-1</sup>. Para evitar contaminação por bactérias, foi adicionado 0,04 mg mL<sup>-1</sup> de sulfaço de estreptomicina ao meio de cultura.

Com a primeira fase, foi possível verificar que, com a concentração utilizada, o desenvolvimento do fungo foi parcialmente inibido, em comparação com a testemunha (placas de Petri contendo apenas meio de cultura).

Posterior ao teste de concentração padrão deu-se início à segunda fase do experimento, com a finalidade de verificar a atividade antifúngica de diferentes

concentrações de OE de *C. fissilis* no controle *in vitro* de *P. pedicariae*. A metodologia de instalação do experimento foi a mesma descrita para a primeira fase, com exceção das concentrações utilizadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Tratamentos utilizados para avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Cedrela fissilis* frente ao fungo *Phoma pedicariae*.

<b>Tratamentos de Controle</b>	
<b>C0</b>	Testemunha
<b>C-</b>	Controle negativo - Etanol (1,0 µL mL <sup>-1</sup> )
<b>C1</b>	0,5 µL mL <sup>-1</sup>
<b>C2</b>	0,75 µL mL <sup>-1</sup>
<b>C3</b>	1,0 µL mL <sup>-1</sup>
<b>C4</b>	1,5 µL mL <sup>-1</sup>
<b>C+</b>	Controle positivo – Propconazole <sup>®</sup> (1,0 µL mL <sup>-1</sup> )

A partir da instalação do experimento, foram realizadas medições do diâmetro da colônia (média de duas medidas diametralmente opostas), com o auxílio de um paquímetro digital, até os 14 dias. Essas medições foram realizadas diariamente, até o preenchimento de ½ da placa testemunha. Dessa forma, foi possível a obtenção do crescimento micelial (CM), taxa de crescimento micelial (TCM), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), empregando-se a fórmula de Maguirre (1962) adaptado por Oliveira (1991), e inibição do crescimento micelila (ICM) conforme Nascimento et al. (2013).

$$TCM = Dn/n$$

Onde:

TCM = taxa de crescimento micelial;

Dn = diâmetro da colônia ao final da avaliação;

n = dia da última avaliação.

$$IVCM = \sum ((D - Da)/N)$$

Onde:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação.

$$\text{ICM} = ((D_t - DT/D_t) * 100)$$

Onde:

ICM = inibição do crescimento micelial;

D<sub>t</sub> = diâmetro da testemunha;

DT = diâmetro do tratamento.

O experimento foi realizado com seis repetições, tendo as concentrações e controles positivo e negativo como fatores de variação, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, e para as concentrações de OE foi utilizada análise de regressão para verificar o ajuste da equação, através do programa estatístico Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

### 3.5 Resultados e Discussão

#### 3.5.1 Rendimento e composição química do óleo essencial de *Cedrela fissilis* Vell.

O rendimento médio obtido para o óleo essencial (OE) de folíolos frescos (Figura 11) de *Cedrela fissilis*, nos três anos de avaliação praticamente não se diferenciou, com exceção do ano de 2016, que apresentou um rendimento superior aos demais anos. Nos anos de 2015 e 2017, os rendimentos médios de OE foram de 0,038% e 0,026%, respectivamente, diferenciando do ano de 2016, que foi de 0,086%.

No ano de 2016, as folhas de *C. fissilis* apresentavam um excessivo ataque de insetos, fazendo com que estas folhas apresentassem uma fina camada de substância viscosa nas camadas abaxial e adaxial. Segundo Tajkarimi et al. (2010), geralmente os OE são secretados como um mecanismo de defesa contra pragas, sendo que a característica de volatilidade das substâncias garante às plantas um meio de comunicação e sinalização química (CARDOSO et al., 2000), importante nas interações planta-planta e planta-inseto (GLINWOOD et al., 2011). Dessa forma, sugere-se que o maior rendimento obtido no ano de 2016 tenha sido como resposta da planta ao ataque severo de pragas, fazendo com que as folhas produzissem mais metabólitos secundários como mecanismo de defesa.

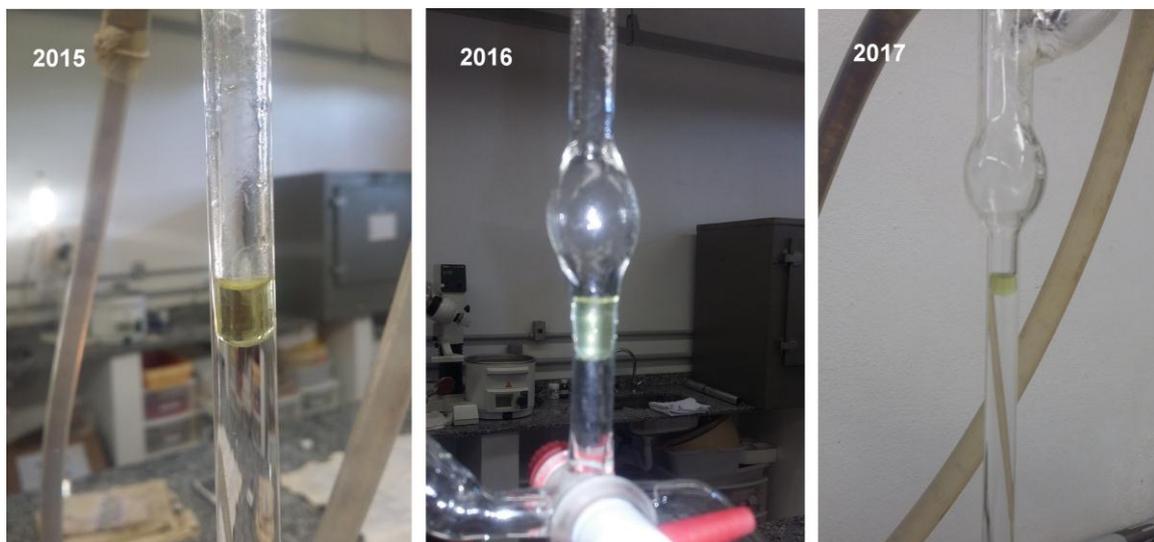


Figura 11. Obtenção do óleo essencial de *Cedrela fissilis* Vell., nos anos de 2015, 2016 e 2017, por meio do método de hidrodestilação.

Ao final dos três anos de avaliação foram identificados 45 componentes do OE obtido de folhas frescas de *C. fissilis* (30 hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 13 sesquiterpenoides oxigenados, 1 diterpenoide e 1 sem identificação), correspondendo a, aproximadamente, 90% da composição total do OE nos três anos de coleta. Como pode ser observado na Tabela 7, grande parte dos constituintes são hidrocarbonetos sesquiterpênicos, naturalmente encontrados em metabólitos secundários, como os OEs, e, muitas vezes, desempenhando um papel importante, possuindo atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante (ABRAHAM, 2001).

A partir da análise por cromatografia gasosa por detector de ionização em chama (GC-DIC) foi possível observar a predominância das substâncias  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -cubebeno, germacrene D, viridiflorol, espatulenol e elixeno, presentes, em sua grande maioria, em uma ou mais coletas. Lago et al. (2004) relataram a presença de algumas dessas substâncias, em análise da composição do OE da mesma espécie de estudo, como o espatulenol, viridiflorol e  $\beta$ -cariofileno.

Da mesma forma, Maia et al. (2000) ao analisarem a composição do OE de *Cedrela fissilis*, *C. odorata* e *Toona ciliata*, observaram a presença de, praticamente, hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Além disso, o componente principal do OE de *C. fissilis* foi a substância bicilogermacreno, encontrada no presente estudo, mas não ultrapassando 2% da composição do OE.

Com isso, ressalta-se o que foi explanado por Gobbo-Netto e Lopes (2007), que afirmaram que determinados fatores influenciam o conteúdo de metabólitos secundários, como a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, e até mesmo a indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos.

Com relação à atividade antimicrobiana de OE de *C. fissilis*, Lago et al. (2004) avaliaram a atividade antibacteriana do OE dessa espécie contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, verificando que o óleo de folhas demonstrou atividade antibacteriana moderada contra *S. aureus* e *E. coli* quando comparado ao controle positivo cloranfenicol. De acordo com os autores, a maior atividade antibacteriana do óleo de *C. fissilis* poderia estar relacionada com a presença das substâncias  $\beta$ -cariofileno e bicilogermacreno, descritas na literatura com potencial antimicrobiano.

Leite et al. (2008) afirmaram que essa espécie possui compostos ativos para o controle da doença de Chagas, por ter demonstrado efeito tripanocida. Entretanto, estudos relacionados às atividades biológicas do OE dessa espécie ainda são escassos. A literatura traz alguns artigos referentes a outras espécies desse gênero, como a *Cedreia odorata*, que possui seu OE empregado para diversos fins, como uso medicinal, potencial aromático, sendo utilizado para produção de sabão, desinfetantes e purificadores de ar (ASEKUN; EKUNDAYO, 1999).

Com base nas substâncias encontradas no óleo, verificou-se a presença do composto espatulenol nos três anos de coleta, e de acordo com diversos autores, esse sesquiterpenoide oxigenado merece atenção especial, pois além de influenciar no aroma de muitos óleos de interesse comercial para a indústria de perfumes, possui propriedade antibacteriana e moderada atividade citotóxica frente células tumorais (CHINOUE et al., 1996; SANTOS et al., 2012; LIMBERGER et al., 2004). Além disso, foi verificada a presença de  $\delta$ -Cadinol e  $\tau$ -Cadinol, substâncias essas que possuem propriedade antimicrobiana (GEHRKE et al. 2014). Dessa forma, a combinação dessas substâncias pode ter um efeito positivo na atividade antifúngica, frente a patógenos agressivos, impedindo o ataque severo a espécies florestais de interesse econômico e silvicultural.

Tabela 7 - Composição química do óleo essencial, índice de Kovats calculado, índice de Kovats tabelado, e porcentagem da substância presente no OE de folíolos de *Cedrela fissilis* Vell., nos anos de 2015, 2016 e 2017, Santa Maria, RS.

(continua)

Pico	Constituinte	Índice de Kovats Calculado Intervalo	Índice de Kovats Tabelado	Ano de coleta (%)		
				2015	2016	2017
<i>Hydrocarbonetos Sesquiterpenoides</i>						
1	δ-Elemene	1326 – 1334	1333	-	0,436	2,260
2	α-Cubebeno	1339 – 1346	1345	-	0,195	15,230
3	α-Copaeno	1376	1374	1,387	2,079	-
4	β-Gurjuneno	1388	1387	-	0,955	-
5	β-Cubeneno	1390	1390	0,299	-	-
6	β-Longipineno	1391	1400	1,013	-	-
7	β-Elemene	1393	1387	-	-	9,148
8	β-Cariofileno	1418 – 1421	1418	3,841	20,814	13,120
9	α-Cariofileno	1419	1423	2,852	3,408	2,842
10	Aloaromadendreno	1433	1434	-	-	2,308
11	Seicheleno	1437 – 1459	1460	-	0,317	1,394
12	Aromadendreno	1438 – 1445	1439	2,144	0,217	3,849
13	α-Himacheleno	1442 – 1448	1447	-	0,181	2,173
14	Aristoleno	1451	1455	-	0,268	-
15	Epi-β-Santaleno	1458	1452	-	0,294	-
16	α-Farneseno	1459 – 1503	1462	1,249	2,681	-
17	Biciclogermacreno	1471 – 1476	1471	1,146	0,157	-
18	Y-Muroleno	1473	1473	-	0,268	-

(continua)

<b>19</b>	Germacreno D	1479 – 1481	1479	1,248	11,177	9,100
<b>20</b>	β-Cadineno	1486	1481	-	0,234	-
<b>21</b>	α-Muroleno	1490	1489	-	1,800	-
<b>22</b>	Elixeno	1494 – 1499	1492	-	32,904	23,208
<b>23</b>	γ-Amorpheno	1495	1495	4,102	-	-
<b>24</b>	α-Bisaboleno	1498 – 1508	1498	5,830	1,267	-
<b>25</b>	β-Bisaboleno	1506	1506	-	7,273	-
<b>26</b>	Germacreno A	1507	1506	-	-	3,614
<b>27</b>	γ-Cadineno	1515	1514	1,413	-	-
<b>28</b>	δ-Cadineno	1516 – 1523	1522	1,679	2,167	1,571
<b>29</b>	β-Sesquifelandreno	1522	1522	-	0,346	-
<b>30</b>	Germacreno B	1559	1556	1,781	1,711	-
<i>Sesquiterpenoides Oxigenados</i>						
<b>31</b>	Nerolidol	1539	1541	-	0,261	-
<b>32</b>	Óxido de cariofileno	1567 – 1584	1567	3,335	0,957	0,795
<b>33</b>	Epiglobulol	1568	1564	-	0,240	-
<b>34</b>	Espatulenol	1574 – 1578	1574	27,504	1,376	1,965
<b>35</b>	Viridiflorol	1592 – 1593	1590	7,729	0,735	-
<b>36</b>	β-Eudesmol	1594	1597	-	0,336	-
<b>37</b>	α-Eudesmol	1606 – 1623	1616	1,008	0,474	-
<b>38</b>	1-epi-Cubenol	1628	1627	2,520	-	-
<b>39</b>	τ-Cadinol	1630 – 1638	1636	3,640	0,327	0,820
<b>40</b>	δ-Cadinol	1641 – 1647	1643	3,232	0,456	-

(conclusão)

<b>41</b>	$\tau$ -Murulol	1645 – 1646	1640	1,726	0,258	-
<b>42</b>	$\alpha$ -Cadinol	1653	1653	-	0,635	-
<b>43</b>	Farnesol	1712 – 1719	1713	4,276	0,481	-
<i>Diterpenoides</i>						
<b>44</b>	Fitol	2104	2105	-	-	0,730
<b>45</b>	Cedrano diol	1898	1894	-	-	0,228
<b>Total de constituintes identificados</b>				<b>85,0</b>	<b>98,0</b>	<b>94,0</b>

### 3.5.2 Atividade antifúngica do óleo essencial de folíolos de *Cedrela fissilis* Vell. no controle *in vitro* de *Phoma pedeia*

Os resultados obtidos demonstraram que o crescimento micelial de *Phoma pedeia* foi parcialmente inibido com a aplicação das diferentes concentrações de óleo essencial de *C. fissilis*. Houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações de OE analisadas (Figura 12), com inibição do fungo a partir da concentração de  $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ , sendo superior com o aumento da concentração de OE. Além disso, as concentrações de  $0,5$  e  $0,75 \mu\text{L mL}^{-1}$  diferiram significativamente das concentrações de  $1,0$  e  $1,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ , que apresentaram maior percentual de inibição. Ainda, as diferentes concentrações diferiram significativamente da testemunha (C0), do controle negativo (C-) e do controle positivo (C+).

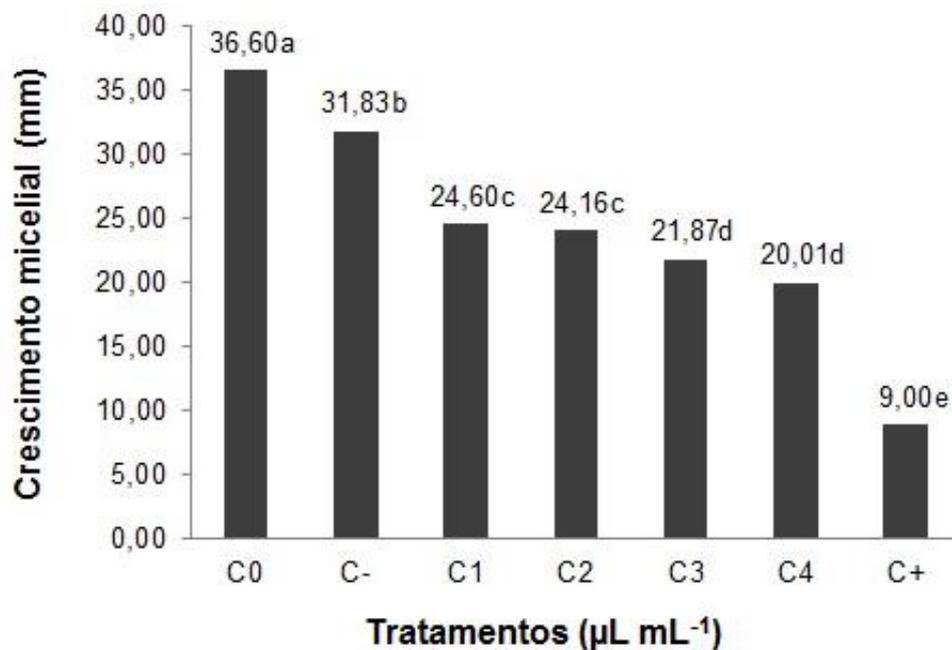


Figura 12. Crescimento micelial (mm), aos quatorze dias, de *Phoma pedeia* submetidos aos tratamentos (C0: testemunha; C-: controle negativo; C1: óleo essencial (OE)  $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; C2: OE  $0,75 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; C3: OE  $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; C4: OE  $1,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; C+: controle positivo).

Como pode ser observado na Figura 13, o crescimento de *P. pedeia* foi menor quando submetido a concentrações maiores de OE, ou seja, com o aumento da concentração de OE, o crescimento do patógeno foi limitado, quando comparado à testemunha.

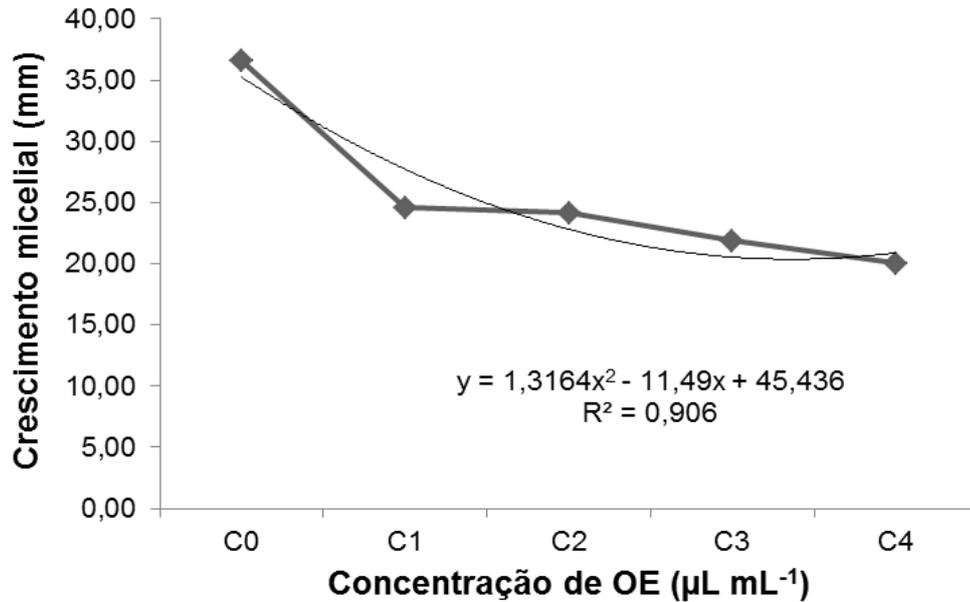


Figura 13. Crescimento micelial (mm), aos sete dias, de *P. pedicariae*, submetidas às diferentes concentrações de OE (C0: testemunha; C1: 0,5 µL mL<sup>-1</sup>; C2: 0,75 µL mL<sup>-1</sup>, C3: 1,0 µL mL<sup>-1</sup>; C4: 1,5 µL mL<sup>-1</sup>), com equação e coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>).

O controle negativo (C-) apresentou diferenças significativas quando comparado à testemunha, demonstrando que esse produto pode ter influência no controle do fungo, porém em menor escala em comparação ao uso do óleo essencial. Com a aplicação do Proconazole<sup>®</sup> (C+), o crescimento do fungo foi inibido em 100%, causando a morte do isolado.

Além disso, o crescimento do fungo quando submetido às diferentes concentrações de OE foi direcionado na direção vertical em relação ao disco, produzindo um micélio aéreo, ou seja, o fungo não consegue explorar o meio de cultura que contém o OE, e acaba explorando o disco repicado (Figura 14).

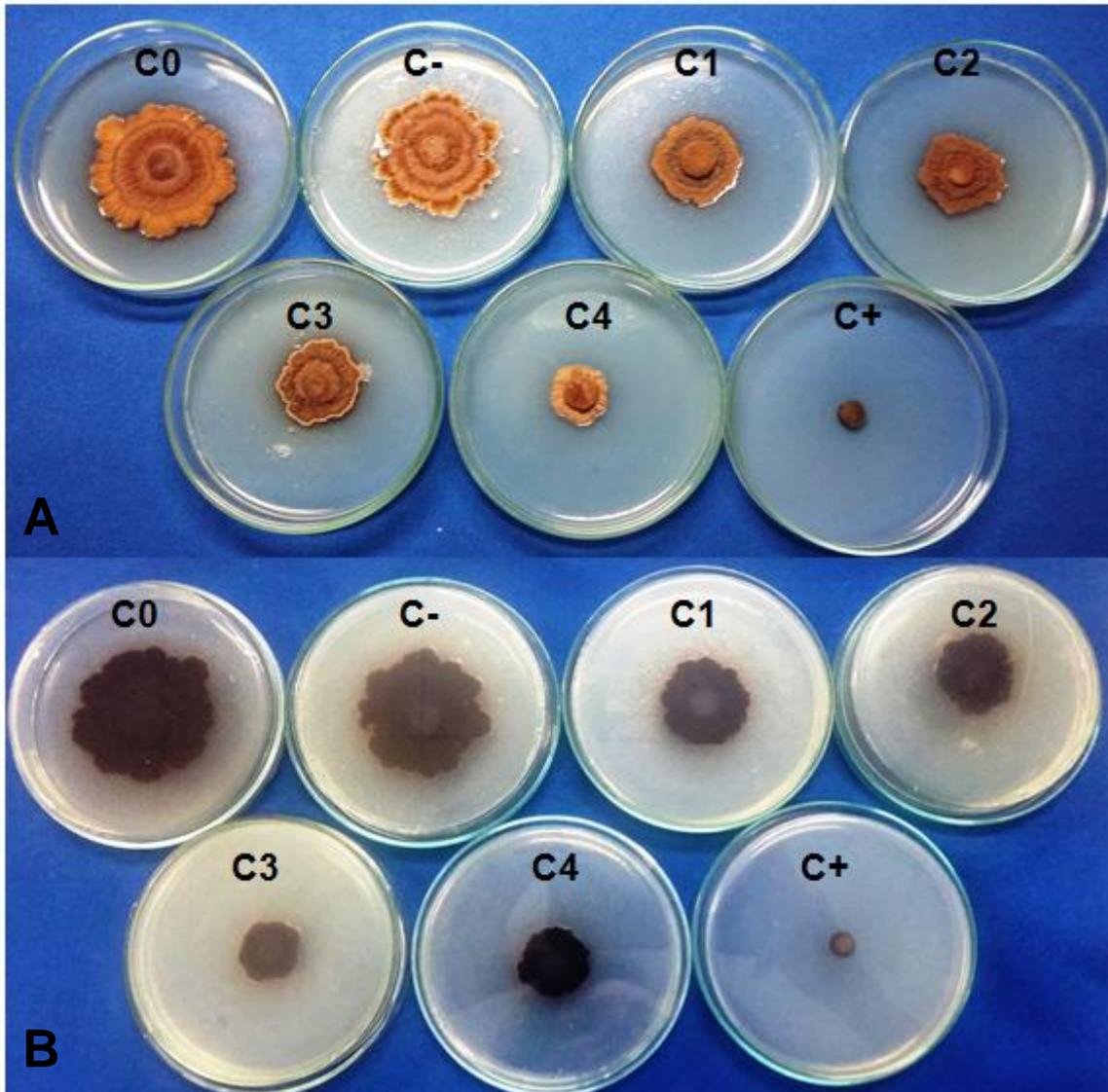


Figura 14. Crescimento micelial, aos quatorze dias, de *Phoma pedicelae*, submetidos aos tratamentos (C0: testemunha; C-: controle negativo; C1: óleo essencial (OE)  $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; C2: OE  $0,75 \mu\text{L mL}^{-1}$ , C3: OE  $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; C4: OE  $1,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; C+: controle positivo). A) visualização do lado superior da placa de Petri (acima da figura) e B) visualização do lado inferior da placa de Petri (abaixo da figura).

Dessa forma, quando submetidas às diferentes concentrações de óleo, tanto a taxa de crescimento micelial (TCM) como o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), que são variáveis correlacionadas, apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que a C1 e C2 diferiram de C3 e C4, demonstrando que a inibição é maior com o aumento da concentração de OE, como pode ser observado na Figura 15. Ainda, os valores de TCM e IVCM variaram de  $1,43 - 2,27 \text{ mm dia}^{-1}$  e  $2,06 - 3,09 \text{ mm dia}^{-1}$ , respectivamente, para as concentrações de OE analisadas.

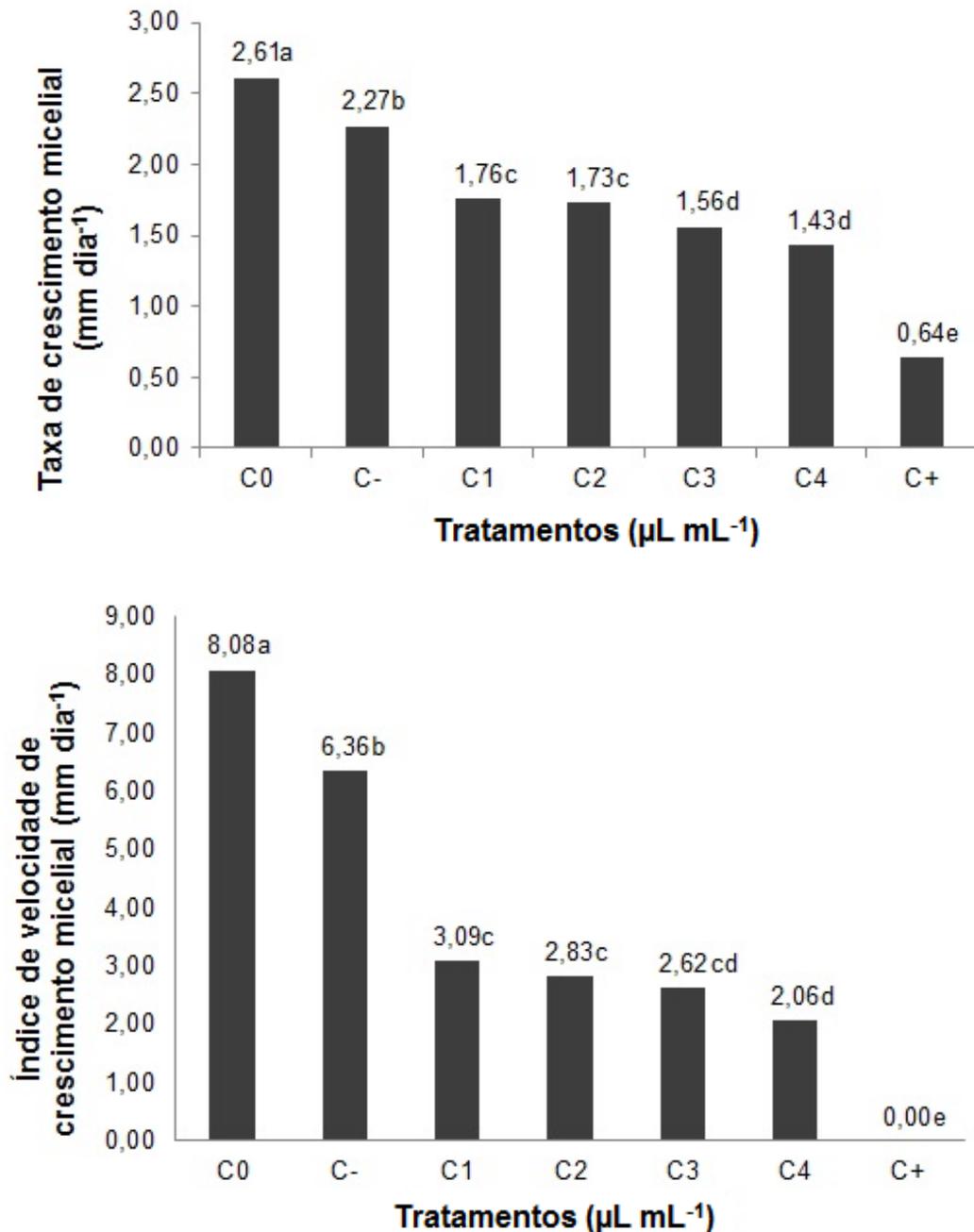


Figura 15. Taxa de crescimento micelial – TCM (mm dia<sup>-1</sup>) e Índice de velocidade de crescimento micelial – IVCM (mm dia<sup>-1</sup>) de *Phoma pedicelae*, submetidos aos tratamentos (C0: testemunha; C-: controle negativo; C1: óleo essencial (OE) 0,5 µL mL<sup>-1</sup>; C2: OE 0,75 µL mL<sup>-1</sup>, C3: OE 1,0 µL mL<sup>-1</sup>; C4: OE 1,5 µL mL<sup>-1</sup>; C+: controle positivo).

Com relação à inibição do OE frente ao patógeno *P. pedicelae*, foi possível observar que, com o aumento da concentração de OE, a inibição do crescimento foi maior, alcançando um ICM de 60,1% com a concentração de 1,5 µL mL<sup>-1</sup> (Figura

16). O mesmo pode ser observado na Figura 14, na qual estão dispostos os tratamentos, e o crescimento micelial de *P. pedicariae*.

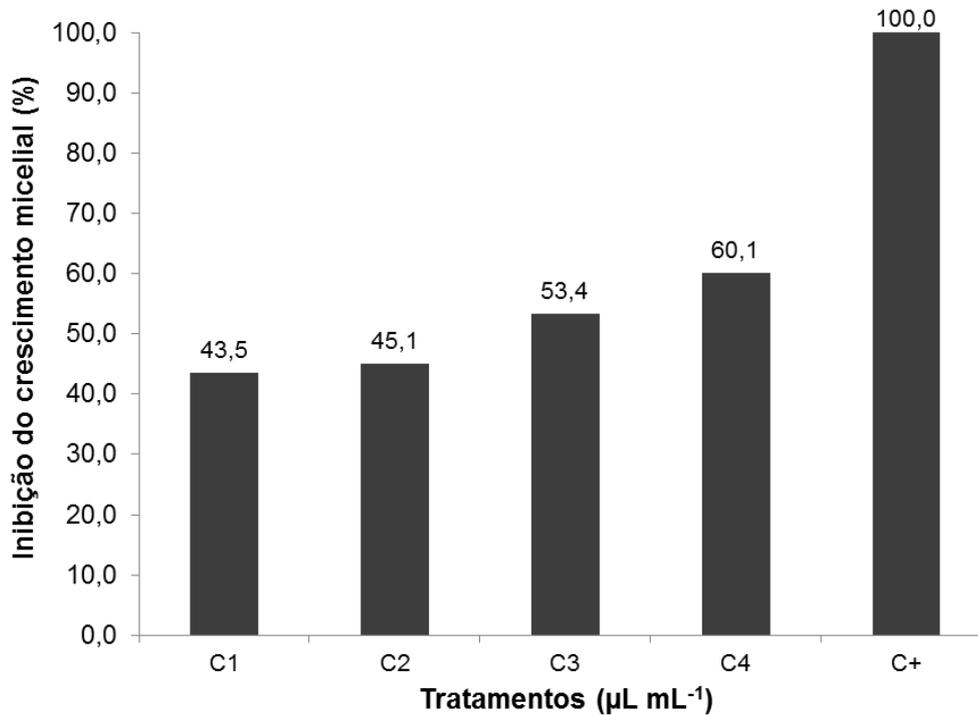


Figura 16. Inibição do crescimento micelial (%), aos quatorze dias, de *Phoma pedicariae*, submetidos aos tratamentos (C1: óleo essencial (OE) 0,5 µL mL<sup>-1</sup>; C2: OE 0,75 µL mL<sup>-1</sup>, C3: OE 1,0 µL mL<sup>-1</sup>; C4: OE 1,5 µL mL<sup>-1</sup>).

Aliado a isso, como pode ser observado na Tabela 8, o óleo de *C. fissilis* possui na sua composição diversos componentes como espatulenol (20,57%), β-cariofileno (14,78%), α-bisaboleno (4,98%), α-cubebeno (4,95%), elixeno (4,92%), δ-cadinol (2,81%) e óxido de cariofileno (2,47%) sendo muitos desses relatados na literatura com propriedades antimicrobianas (ADAM et al., 1998; ARANGO et al., 2004). Dessa forma, sugere-se que a combinação desses componentes encontrados no OE possa ter uma ação antifúngica frente ao patógeno *Phoma pedicariae*, o que é corroborado por Silva (2001), o qual afirma que a combinação de vários componentes na composição de OEs pode atuar em harmonia sinérgica e apresentar uma ampla gama de atuação fungicida ou fungistática (Tabela 8).

Souza et al. (2005) afirmaram que a maior ou menor atividade biológica dos OEs pode ser dependente de constituintes químicos específicos. No entanto, devido à complexidade da composição química de um OE, torna-se difícil relacionar a

atividade biológica com as substâncias presentes, pois a ação atribuída a um composto isolado pode não ser exata, devido à possíveis interações que podem ocorrer entre os compostos do óleo (SANTOS et al., 2009).

Tabela 8 - Composição química do *pool* de óleo essencial índice de Kovats calculado, índice de Kovats tabelado, e porcentagem da substância presente no OE de folíolos de *Cedrela fissilis* Vell., nos anos de 2015, 2016 e 2017, Santa Maria, RS.

Pico	Constituinte	Índice de Kovats Calculado Intervalo	Índice de Kovats Tabelado	Percentual (%)
1	$\delta$ -Elemene	1356	1354	0,21
2	$\alpha$ -Copaeno	1386	1384	2,41
3	$\beta$ -Elemeno	1400	1400	0,72
4	$\beta$ -Gurjuneno	1402	1403	2,64
5	$\beta$ -Cariofileno	1434	1434	14,78
6	Aromadendreno	1450	1451	1,08
7	Seicheleno	1454	1457	0,37
8	$\alpha$ -Cariofileno	1466	1465	4,09
9	$\beta$ -Santaleno	1472	1474	0,67
10	$\alpha$ -Farneseno	1490	1491	3,64
11	Biciclogermacreno	1492	1492	0,57
12	Germacreno D	1498	1498	0,42
13	$\alpha$ -Bisaboleno	1509	1509	4,98
14	Elixeno	1522	1509	4,92
15	$\beta$ -Bisaboleno	1527	1522	0,43
16	$\delta$ -Cadineno	1536	1534	0,92
17	Nerolidol	1562	1562	0,84
18	Germacreno B	1578	1557	1,22
19	Espatulenol	1598	1597	20,57
20	Óxido de cariofileno	1601	1601	2,47
21	d-Ledol	1608	1607	2,24
22	Viridiflorol	1617	1612	1,47
23	$\tau$ -Cadinol	1623	1623	1,56
24	$\alpha$ -Eudesmol	1642	1638	1,25
25	$\delta$ -Cadinol	1670	1668	2,81
26	$\alpha$ -Cadinol	1684	1680	1,81
27	Farnesol	1733	1740	1,82
28	Fitol	2154	2148	1,40
<b>Total de constituintes identificados</b>				<b>82,32</b>

O *pool* do óleo de *C. fissilis* apresentou grande quantidade de espatulenol, que além de influenciar no aroma de diversos OEs, possui propriedades inseticida, citotóxica e antimicrobiana (CANTRELL et al., 2005; PACCIARONI et al., 2000). Além disso, substâncias como biciclogermacreno não possuem relatos quanto à atividade fungicida, porém possuem potencial larvicida comprovado a partir de testes com as larvas do mosquito *Aedes aegypti* (SANTOS et al., 2006).

Yang et al. (2000) afirmaram que a substância óxido de cariofileno, utilizado como conservante em alimentos, drogas e cosméticos, foi testado *in vitro*, tendo sua atividade antifúngica comparada ao ciclopirox olamina e ao sulconazol, que são comumente usados para tratar a onicomicose. Ainda, a literatura relata que esse sesquiterpeno possui atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória, analgésica e antibacteriana (CHINOUE et al., 1996; ZHENG et al., 1992), demonstrando o potencial antimicrobiano dessa substância.

O  $\beta$ -cariofileno, constituinte predominante em diversos OEs de espécies florestais possui influência no aroma de frutos e, devido à sua volatilidade possui diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antialérgica, anestésica, antifúngica e anticarcinogênica (CHINOUE et al., 1996; PASSOS et al., 2007; ZHENG et al., 1992).

Em estudo similar, Fiori et al. (2000) relataram a inibição do fungo *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm, a partir de OE de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., *Corymbia citriodora* Hill & Johnson e *Ageratum conyzoides* L. na concentração de 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . No entanto, para o mesmo fungo, Pattnaik e Subramanyam (1996) afirmaram que a concentração mínima de 0,25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de OE de *C. citriodora* inibiu completamente o desenvolvimento do fungo.

Souza Júnior et al. (2009) observaram que, concentrações superiores a 1,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de OE de *Lippia sidoides* Cham., *Ocimum gratissimum* L., *Lippia citriodora* (Lam.) Kunth e *Psidium guajava* L., causaram a inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. em 100% comparando-se com a testemunha. No entanto, o OE de *P. guajava* apresentou comportamento semelhante com o OE de *C. fissilis*, com inibição crescente do micélio, conforme o aumento das concentrações de OE.

Ao avaliar a atividade antimicrobiana do OE de *Schinus terebinthifolius* Raddi em *Staphylococcus aureus* R., Luchesi (2017) observou que concentrações

de 0,390 - 0,781  $\mu\text{L mL}^{-1}$  causavam a inibição da bactéria, demonstrando o potencial do OE dessa espécie florestal. Ainda, Freddo et al. (2016) em trabalhos de controle do fungo *Fusarium* spp. a partir do OE de *Aloysia citriodora* Palau, relataram o efeito fungicida do óleo em concentrações superiores a 0,125  $\mu\text{L mL}^{-1}$ .

Alguns autores indicam que o mecanismo de ação dos OEs pode estar associado à interrupção da membrana da célula do fungo, sendo o ergosterol o principal componente de esterol (RODRIGUES et al., 2013; REUK-NGAM et al., 2014). Entretanto, a exploração do mecanismo de ação antifúngica do OE pode ser influenciada por uma grande variedade de fatores, como os diferentes índices quantitativos e qualitativos de seus componentes (GULLO et al., 2016). Os autores ressaltaram que os diferentes componentes de um OE pode ter efeito antagônico, sinérgico ou aditivo sobre células microbianas, o que podem influenciar sua atividade antifúngica geral.

Com relação ao presente estudo, pode-se observar que o OE de *C.fissilis* teve um efeito fungistático relativo em relação ao fungo, inibindo parcialmente o seu crescimento com o aumento da concentração de OE. Dessa forma, os resultados obtidos demonstraram que o óleo essencial de *Cedrela fissilis* Vell. inibiu o crescimento micelial de *Phoma pedeciae* a partir da concentração de 0,5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , indicando boas perspectivas para uso desse óleo no controle de patógenos.

### 3.6 Conclusões

- Foram identificados 45 componentes do óleo essencial obtido de folíolos frescos de *Cedrela fissilis*, correspondendo a, aproximadamente, 90% da composição total do óleo essencial nos três anos de coleta;

- As substâncias antimicrobianas  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -cubebeno, viridiflorol, espatulenol, elixeno e germacreno D foram predominantes.

- O óleo essencial de *Cedrela fissilis* Vell. apresenta atividade fungistática relativa frente ao isolado de *Phoma pedeiaae* a partir da concentração de  $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$  sendo indicado para uso no controle de patógenos, por se tratar de um composto de origem vegetal, não causando prejuízos ao meio ambiente.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem poucos relatos acerca de doenças incidentes em espécies arbóreas tropicais e tratando-se de espécies florestais nativas, o relato da ocorrência de doenças ainda é menor. Dessa forma, como pode ser observado no Capítulo 1 deste estudo, o conhecimento dos patógenos que atacam as espécies florestais, o grau de severidade e as condições ambientais adequadas para que as doenças ocorram são os primeiros passos para a definição de medidas de manejo, a fim de minimizar prejuízos e promover o estabelecimento da árvore na floresta.

Ainda, com relação à sanidade de plantas, ocorre uma carência de pesquisas, principalmente quando relacionadas à espécies florestais nativas, como a *Cedrela fissilis* Vell., sendo que foi a partir da incidência de patógenos causadores de manchas foliares que o presente estudo teve sua base inicial, com o isolamento e caracterização de *Phoma pedeiae*, ainda não descrito para a espécie florestal em estudo.

Aliado a isso, o controle de patógenos causadores de doenças tem se tornado tema central de muitas pesquisas, e o surgimento de métodos alternativos merece um destaque especial, como o uso de compostos secundários presentes no extrato bruto ou em óleo essencial (OE) de plantas medicinais e espécies florestais, podendo constituir em uma potencial forma de controle de doenças em plantas.

No Capítulo 2 foram abordadas algumas funções ecológicas que os OEs apresentam, especialmente na proteção contra predadores e como potencial agente defensor contra bactérias, fungos e infestantes. Como pôde ser observado no presente estudo, o OE de *C. fissilis* apresentou compostos ativos que atuaram com eficiência no controle do patógeno *P. pedeiae*, apresentando uma atividade fungistática relativa, diminuindo drasticamente o crescimento do fungo quando comparado à testemunha.

Essa atividade se deve, principalmente, a composição do OE de *C. fissilis*, que possui constituintes com características, descritas na literatura, com ação antimicrobiana, e, a partir deste estudo, pode-se afirmar que o OE dessa espécie também possui ação fungistática frente ao patógeno *P. pedeiae*, sendo recomendada a sua utilização, causando o mínimo de danos ao meio ambiente.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, W. R. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.583-606, 2001.

ADAM, K. et al. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirusutum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46, p.1739-1745, 1998.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois: **Allured Publishing Corporation**. 2009.

AGROLINK. **Mancha foliar causada por *Phoma pinodella***. Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/culturas/problema/mancha-foliar\\_2587.html](https://www.agrolink.com.br/culturas/problema/mancha-foliar_2587.html)>. Acesso em: 06/01/2018.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV, 382p, 2007.

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.

ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P., PASCUAL-VILLALOBOS, M. J., Effect of fertilizer on yield and composition of flower head essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. **Industrial Crops and Production**. v. 17, p. 77–81. 2003.

AMBROZIN, A. R. P. et al. Limonoids from andiroba oil *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, p.542-547, 2006.

ANGIONI, A. et al. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.12, p. 4364-4370, 2006.

ANJOS, J. R. N. et al. Mancha foliar em baru (*Dipteryx alata*) causada por *Phoma multirostrata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 31, n. 2, p. 593-595, 2009.

ASEKUN, O. T., EKUNDAYO, O. Constituents of the leaf essential oil of *Cedrela odorata* L. from Nigeria. **Flavour Fragrance Journal**, v.14, p. 390-392, 1999.

ARANGO, A. C. M., SÁNCHEZ, J. G. B., GALVIS, L. A.B. Productos naturales con actividad antimicótica. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, v.7, p.325-331, 2004.

ASSIS, L. A. G. **Doenças fúngicas em espécies florestais nativas na Amazônia Central**. Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 46 p, 2006.

AVESKAMP, M. M.; GRUYTER, J.; CROUS, P. W. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. **Fungal Diversity**, v.31, p.1–18, 2008.

AVESKAMP, M. M. et al. Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Studies in Mycology**, v.65, p. 1–60, 2010.

BAJWA, S.; KULSHRESTHA, A. Fungal infections in intensive care unit: Challenges in diagnosis and management. **Annals of Medical and Health Science Research**. v.3,p. 238, 2013.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essentials oil: a review. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BANERJI, R.; NIGAM, S. K. Wood constituents of Meliaceae: A Review. **Fitoterapia**, v.55, n.3. 1983.

BASIM, H.; YEGEN, O.; ZELLER, W. Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.107, p. 279-284, 2000.

BAYALA, B. et al.. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - A review. **American Journal of Cancer Research**. v.19, p. 591–607, 2014.

BEDENDO, I. P. **Ambiente e doença**. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Eds). Manual de Fitopatologia. V. 1. Princípios e Conceitos. 3 ed. São Paulo, Agronômica Ceres. p. 848-858. 1995.

BOEREMA, G. H., BOLLEN, G. J. Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. **Persoonia** v.8, p.111–144, 1975. Disponível em: <http://www.mykoweb.com/systematics/journals/Persoonia/Persoonia%20v08n2.pdf>. Acesso em: 03/01/2018.

BOEREMA G.H. Contributions towards a Monograph of *Phoma* (Coelomycetes) V. Subdivision of the genus in sections. **Mycotaxon**, v. 64, p. 321-333. 1997.

BOEREMA, G. H.et al. **Phoma identification manual**. CAB International, Wallingford, 470 p, 2004.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 546 p., 2010.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n.3, p. 223-253, 2004.

- CANTRELL, C. L. et al. Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.15, p. 5948-5953, 2005.
- CARDOSO, M. G. et al. **Óleos essenciais**. Lavras: UFLA/PROEX, 42 p. (Boletim de Extensão, 73). 2000.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília: Serviço de Produção de Informação: CNPF/Embrapa,. 640 p., 1994.
- CARVALHO, P.E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: EMBRAPA, 1039p., 2003.
- CHARCHAR, M. J. A.; ANJOS, J. R. N.; MELO, J. T. Infecção Natural de Jatobá por *Phomopsis* sp. no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, 28:316-318. 2003.
- CHEN, Q. et al. Resolving the *Phoma* enigma. **Studies in Mycology**, 82: 137–217, 2015a.
- CHEN, Q. et al. A polyphasic approach to characterize two novel species of *Phoma* (Didymellaceae) from China. **Phytotaxa**, 197: 267–281, 2015b.
- CHEN, Q. et al. Didymellaceae revisited. **Studies in Mycology**, 87: 105–159, 2017.
- CHINO, I.B. et al. Chemical and biological studies on two elichrysum species of Greek origin. **Planta Medica**, v.62, n.4, p.377-379, 1996.
- CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 4, n. 23, p. 54-63, 1986.
- CROTEAU, R., Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. Herbs, spices and medicinal plants. **Recent Advances in Botanic, Horticulture and Pharmacology**. v.1, p. 81–135. 1986.
- CROUS, P. W. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. **Studies in Mycology**, 50: 19–22, 2004.
- DA SILVA, D. T.; HERRERA, R.; BATISTA, B. F.; HEINZMANN, B. M.; LABIDI, J. Physicochemical characterization of leaf extracts from *Ocotea lancifolia* and its effect against wood-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, p. 158-170, 2017.
- DIAS, R. C. S. et. Avaliação de resistência a *Spherotheca fuliginea* e a *Didymella bryoniae* em melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 17, p.13-19, 1999.
- DJILANI, A., DICKO, A., **The therapeutic benefits of essential oils**. In: Bouayed, J., Bohn, T. (Eds.), Nutrition, Well-being and Health. InTech, Croatia, pp. 155–178, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, 13-15, 1991.

FERNANDES, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo – RS: EMATER – CNPT, 128p., 1993.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: UFV, SIF, 570 p., 1989.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FIORI, A. C. G. et al. Antifungal Activity of Leaf Extracts and Essential Oils of some Medicinal Plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v.148, p. 483-487, 2000.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE OF UNITED NATIONS. **State of the World's Forests**. Rome, 164 p., 2011.

FREDDO, A.R. et al. Redução no tombamento de *Fusarium* sp. em plântulas de beterraba, pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *Aloysia citriodora* Palau. **Scientia Agraria Paranaensis** v.15, n.4, p. 453-459, 2016.

GANG, D. R. Evolution of Flavors and Scents. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 56, p. 301–25, 2005.

GEHRKE, I.T.S. Atividade antimicrobiana e composição química do óleo essencial de *Schinus polygamus* (Anacardiaceae). Sociedade Brasileira de Química (SBQ). **Anais...** 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2014.

GLINWOOD, R.; NINKOVIK, V.; PETTERSSON, J. Chemical interaction between undamaged plants – Effects on herbivores and natural enemies. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1683-1689, 2011.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química. Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007. Disponível em: [http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol30No2\\_374\\_25-RV05289.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol30No2_374_25-RV05289.pdf). Acesso em: 20/03/2017.

GODFREY, C. R. A. **Agrochemical from Natural Products**, Marcel Dekker Inc., New York, 1994.

GOMES, R.; BUSTAMANTE E. Influencia de la luz y la temperatura en el desarrollo de la muerte descendente del cafeto causado por *Phoma* sp. **Fitopatologia Colombiana**. v.6, p.73-80, 1977.

GOÑI, P. et al., Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v.116, n.4, p. 982-989, 2009.

GRUYTER, J. Molecular phylogeny of Phoma and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the Phoma complex. **Mycological Research**, 113: 508–519, 2009.

GUARIZ, H.R. et al. Aspectos anatômicos e ecofisiológicos de *Cedrela fissilis* Vell. sob diferentes níveis de sombreamento. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 4., 2006. **Anais...** Campina Grande: Universidade do Vale do Paraíba, p. 2794-2797, 2006.

GULLO, F. P. Essential oils and major compounds of *Hedychium coronarium* Koenig (Zingiberaceae) against pathogenic yeast of *Candida* and *Cryptococcus* genus. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 37, n.1, 2016.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Oxford, n. 41, p. 95 – 98, 1999. Disponível em: <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>. Acesso em: 10/01/2018.

HANADA, R. E., GASPAROTTO, L.; FERREIRA, A. F. Primeiro relato de mancha foliar em *Cedrela odorata* causada por *Pseudobeltrania cedrelae*. **Fitopatologia Brasileira**, 30:299-301. 2005.

HARBONE, J. B. **Ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic, 1993.

HUSSAIN, A.I. et al. Chemical composition, antioxidante and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**. v. 108, p. 986–995. 2008.

HYLDGAARD, M., MYGIND, T., MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front Microbiol.** v. 3, p.1–25, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, INMET . Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos>.

IRITI, M.; FAORO, F. Chemical diversity and defence metabolism: How plants cope with pathogens and ozone pollution. **International Journal of Molecular Sciences**. v.10, p. 3371–3399, 2009.

ISMAN, M.B.; WILSON, J. A.; BRADBURY, R. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni* in relation to their chemical compositions. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 82-87, 2008.

ISO/DIS9235. **International Standard Organisation**. Aromatic natural raw materials-vocabulary. p. 9-10, 2013.

JEONG, E. J. et al. Inhibitory effect of cinnamon essential oils on selected cheese-contaminating fungi (*Penicillium* spp.) during the cheese-ripening process. **Food Science and Biotechnology**, v.23, n.4, p. 1193-1198, 2014.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n.10, p. 813-829, 2003.

KHORSHIDIAN, N. et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.45, p. 62–72, 2018.

KÖVICS, G. J. et al. *Phoma* like fungi of soybeans. **Critical Reviews in Microbiology**. 2013.

LAGO, J.H.G., et al. Volatile oils from leaves and stem barks of *Cedrela fissilis* (Meliaceae): Chemical composition and antibacterial activities. **Flavour and Fragrance Journal**. vol.19, n.5, p.448-451. 2004.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul.** Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 156p, 2013.

LEE, H. K. et al. Isolation and characterization of a novel analyte from *Bacillus subtilis* SC-8 antagonistic to *Bacillus cereus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.110, n.3, p. 298-303, 2010.

LEITE A.C; et al. Trypanocidal activity of limonoids and triterpenes from *Cedrela fissilis*. **Planta Medica**. v.74, n.15, p.1795-1799. 2008.

LIMA, L. M. et al. Relação nitrogênio/potássio com a mancha de *Phoma* e nutrição de mudas de cafeeiro em solução nutritiva. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 223-228. 2010.

LIMBERGER, R.P. et al. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.27, n.6, p.916-919, 2004.

LISBOA, D. O. et al. First report of *Botryosphaeria ceous* fungi causing canker on *Cedrela fissilis* and leaf spots on *Cariniana estrellensis* in forest nursery in Brazil. **Forest Pathology**. v.46, n. 4, 2016.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Editora Plantarum, 252 p. 1992.

LOVATTO, P. B. et al. A utilização da espécie *Melia azedarach* L. (Meliaceae) como alternativa à produção de insumos ecológicos na região sul do Brasil . **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.7, n.2, p. 137- 149, 2012.

LUCHESE, L. A. **Atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante de óleos essenciais**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 88p. 2017.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Óleos essenciais da Amazônia: inventário da flora aromática**. In: Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais. Belém: UFPA, NUMA, POEMA, p. 127-137. 1998.

MAIA, B. H. L. N. S. et al. Essential oils of *Toona* and *Cedrela Species* (Meliaceae): taxonomic and ecological implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.11, n.6, pp.629-639. 2000..

MASOTTI, V. et al. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.24, p. 7115-7121, 2003.

MATOS, A. P. et al. Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia* spp. sobre a lagarta do cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em dieta artificial. **Bioassay**. v.1, n.10, p. 1-, 2006.

MICHEREFF, S.J. et al. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 656-663, 2003.

MUNSELL SOIL COLOR CHARTS, Macbeth Division of Kollinorgen Instruments Corporation, 2009.

NASCIMENTO, A. R. T.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Estrutura e padrões de distribuição espacial de espécies arbóreas em uma amostra de floresta ombrófila mista em Nova Prata, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.11, n.1, p.105-119, 2001.

NASCIMENTO, J.M. et al. Inibição do crescimento micelial de *Cercospora calendulae* Sacc. por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 751-756, 2013.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, n.12, p. 1451-1474, 2013.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: Their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**. v.39, p.395–400, 2004

NIST, **NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY**. Standard Reference Materials - SRM 2709, 2710 and 2711 Disponível em: <[http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/archived\\_certificates](http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/archived_certificates)>.

NOJOSA, G. B. A. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de *Phoma*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.1, p.60-62, 2009.

NUNES, E. C. et al. **Micropropagação de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. In: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (eds) Protocolos para Micropropagação de Árvores Arborizadas e Frutas. Springer, Dordrecht, 2007.

OHMIZO, C.; YATA, M.; KATSU, T. Bacterial cytoplasmic membrane permeability assay using ion-selective electrodes. **Journal of Microbiological Methods**. v.59, p.173–179, 2004.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 111p., 1991.

O'BRYAN, C.A.; PENDLETON, S.J.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture - In vitro studies on antibacterial mode of action. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, 2015.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323-333, 2007.

PACCIARONI, A. D. V. et al. ; Bioactive constituents of *Conyza albida* . **Planta Medica**. v.66, n. 8, p.720–723, 2000.

PARLEVLIE, J. E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, p. 203-222, 1979.

PATTNAIK, S. V. R.; SUBRAMANYAM .C.K. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. **Microbios**, v. 86, p. 237-246, 1996.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**. 76, 51–167, 2013.

POZZA, A. A. A. et al. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha olho pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** , v. 36, p.53-60, 2001.

RAI, M. K. et al. Advances in Taxonomy of Genus *Phoma*: Polyphyletic Nature and Role of Phenotypic Traits and Molecular Systematics. **Indian Journal of Microbiology**, v.54, n.2, p.123–128, 2014.

REITZ, R.; KLEIN R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. Itajaí: Sellowia, n. 34-35, p. 1- 525. 1988.

REUK-NGAM, N. et al. Antimicrobial activity of Coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. **BioMed Research International**. 2014;

RODRIGUES, D. F., et al. Chemical Composition and Trypanocidal Activity of the essential oils from *Hedychium coronarium* J. Koenig (Zingiberaceae). **ISRN Infectious Diseases**. 2013;

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, n.2, p.43-50, 2001.

RUIZ FILHO, R. R. et al. Fungos associados às sementes de cedro. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 4, p. 494-496, 2004. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/428055>. Acesso em: 10/02/2017.

RUSSO, R. et al. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

SALGADO, M.; RESENDE, A.; PFENNING, L. H. Primeiro Relato da Ocorrência de *Didymella* sp. fase sexuada de *Phoma tarda* em *Coffea arabica* no Brasil. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** V Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Brasília: Embrapa Café, 2007.

SANTOS, A. F. et al. **Doenças da pupunheira no Estado do Paraná**. Circular Técnica 90. Embrapa. 4p. 2004. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/287463/doencas-da-pupunheira-no-estado-do-parana>. Acesso em: 29/08/2017.

SANTOS, R. P., NUNES, E. P., NASCIMENTO, R. F. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v.17, p.1027-1030, 2006.

SANTOS, A. C. A. et al. Chemical Composition of the Essential Oils from Leaves and Fruits of *Schinus molle* L and *Schinus terebinthifolius* Raddi from Southern Brazil. **Journal of Essential Oils Bearing Plants**, v. 12, p. 16-25, 2009.

SANTOS, R.F. et al., Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p.224-234, 2012.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311-313, 2006.

- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Extratos vegetais e de cogumelos no controle de doenças de plantas. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 27, n. 2, p.4038-4045, 2009. Disponível em: [http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev\\_3/MR\\_4\\_Artigo\\_Katia\\_Regina\\_Estrada.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_3/MR_4_Artigo_Katia_Regina_Estrada.pdf). Acesso em: 09/12/2017.
- SHARIFI-RAD, J. et.al. Biological Activities of Essential Oils: from Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v.22, n.70, 2017.
- SILVA, A.R. **Tudo sobre aromaterapia**: como usá-la para melhorar sua saúde física, emocional e financeira. 2a . Ed. São Paulo SP. Editora Roca Ltda. 2001.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos essenciais**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 467-495. 2004.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, v.18, n.4, p. 463-470, 2001.
- SOUZA, E. L. et al. Inibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p.245-250, 2005.
- SOUZA JÚNIOR, I. S.; SALES, N. L. P. MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v.22, n.3, 2009.
- STAMP, N. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. **The Quarterly Review of Biology**. v.78, n. 1, p. 23-55, 2003.
- TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n.9, p. 1199-1218, 2010.
- TAMURA, K. et. al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p.1596-1599, 2007.
- TRINDADE, A. S.; COELHO NETTO, R. A. Levantamento de doenças em viveiro de espécies florestais. **Anais...** In: Anais da XII Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA/CNPg . Manaus, 2003. Disponível em: <http://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/123/6648/1/Aurea%20da%20Silva%20Trindade.pdf>. Acesso em: 16/01/2017.
- ULTEE, A.; BENNIK, M.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environment Microbiology**. v.68, p.1561–1568, 2002.

VIANA, F. M. P. **Ocorrência e Controle da Mancha-de-Phyllachora em Cedro no Estado do Ceará.** Comunicado técnico 186. Embrapa. 2012. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-/publicacao/951707/ocorrencia-e-controle-da-mancha-de-phyllachora-em-cedro-no-estado-do-ceara>. Acesso em: 27/08/2017.

VIANA, F. M. P. et al. **Fungos associados a algumas espécies florestais madeireiras no Distrito de Irrigação de Acaraú-Marco, CE .** Comunicado técnico 155, Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/951772/fungos-associados-a-especies-florestais-madeireiras-no-distrito-de-irrigacao-de-acarau-marco-ce>. Acesso em: 20/08/2017.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento;** 1<sup>a</sup> ed., Florianópolis/Porto Alegre, 1104p., 1999.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo Essencial de Eucalipto.** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz: USP, 2003. (Documentos florestais, 17). Disponível em: <http://www.ipef.br/publicacoes/docflorestais/df17.pdf>. Acesso em: 16/04/2017.

WHITE, T. J., T. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, Academic Press, Inc., New York, p. 315-322 1990.

WHITE, D.G. et al. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infection.** v.4, p. 405-41, 2002.

YANG, D. et al. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. **Mycopathologia**, v.148, n.2, p.79-82, 2000.

ZACARONI, A. B. et al. Occurrence of *Phyllachora balansae* in *Toona ciliata* in Southern Minas Gerais State, Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 3, p. 219, 2013.

ZHANG, H. F.; YANG, X. H.; WANG, Y. Microwave assisted extraction of metabolites from plants: Current status and future directions. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 672-688, 2011.

ZHANG, J.; BRUTON, B. D.; BILES, C. L. Cell wall-degrading enzymes of *Didymella bryoniae* in relation to fungal growth and virulence in cantaloupe fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v.139, n. 749, 2014.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**. v.55, n.7, p.999-1003, 1992.

ZHENG, L. et al. First Report of *Phoma herbarum* Causing Leaf Spot of Oil Palm (*Elaeis guineensis*) in China. **Plant Disease.**, v.101, n. 4, p. 629, 2017.

## ANEXO A – DESCRIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO TRABALHO

### **Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)**

39 g de BDA;

1 L de água destilada;

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV, 2007. 382p.

### **Meio de cultura suco V8-ágar**

200 mL de suco V8;

3 g CaCO<sub>3</sub>;

20 g Ágar;

1 L de água destilada;

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV, 2007. 382p.

### **Meio de cultura suco de cenoura-ágar (CA)**

200 g de cenoura cortada em pedaços;

1 L de água destilada;

20 g de ágar;

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV, 2007. 382p.