



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PROSPECÇÃO DE *GERANIOL SYNTHASE (GES)* EM ESPÉCIES
AROMÁTICAS E USO DO ÓLEO DE KENAF PARA CONTROLE DA
RAMULOSE NO ALGODOEIRO**

KALINY VEIGA PESSOA DA SILVA

**RECIFE-PE
2016**

Kaliny Veiga Pessoa da Silva

TESE DE DOUTORADO

**PROSPECÇÃO DE *GERANIOL SYNTHASE (GES)* EM ESPÉCIES
AROMÁTICAS E USO DO ÓLEO DE KENAF PARA CONTROLE DA
RAMULOSE NO ALGODOEIRO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, ponto focal Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia na Agropecuária
Linha de Pesquisa: Agroecologia

Orientador: Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho/ UFRPE

Co-orientadora: Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos/ Embrapa Algodão

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária

RECIFE-PE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586p Silva, Kaliny Veiga Pessoa da
Prospecção de *geraniol synthase (GES)* em espécies aromáticas e
uso do óleo de kenaf para controle da ramulose no algodoeiro /
Kaliny Veiga Pessoa da Silva. – 2016.
90 f. : il.

Orientador: Péricles de Albuquerque Melo Filho.

Coorientadora: Roseane Cavalcanti dos Santos.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO,
Recife, BR-PE, 2016.

Inclui referências.

1. Extratos vegetais 2. Fungicida 3. Fitopatógeno I. Melo Filho,
Péricles de Albuquerque, orient. II. Santos, Roseane Cavalcanti dos,
coorient. III. Título

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:
Kaliny Veiga Pessoa da Silva

Prospecção de *geraniol synthase* (*GES*) em espécies aromáticas e uso do óleo de kenaf
para controle da ramulose no algodoeiro

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida em: 22/08/2016

Orientador:

Prof. Dr. *Péricles de Albuquerque Melo Filho*
Departamento de Agronomia – UFRPE

Examinadores:

Prof. Dr. *José Jaime Vasconcelos Cavalcanti*
Embrapa Algodão

Prof. Dr. *José Luiz Sandres Carvalho Filho*
Departamento de Agronomia – UFRPE

Prof. Dr. *Reginaldo de Carvalho*
Departamento de Biologia – UFRPE

Profa. Dra. *Vivian Loges*
Departamento de Agronomia – UFRPE

Recife – PE
2016

DEDICATÓRIA

Dedico a meus pais Gilson José da Silva e Ana Paula Carneiro da Veiga Pessoa, por todo apoio e amor que me dedicaram.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela disponibilidade de infraestrutura para a realização deste trabalho.

A CAPES/CNPq/Rede Repensa, pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação Renorbio, pela assistência e conhecimento adquirido.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e seus pesquisadores, em especial aos pesquisadores Dra. Roseane Cavalcanti, Dra. Liziane Lima e Dr. Jaime Cavalcanti, pela disponibilidade de infraestrutura e apoio cedido na conclusão desse trabalho.

Aos membros da banca por se disponibilizarem a compartilhar conhecimentos e a contribuir para conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho pela confiança e incentivo.

A minha co-orientadora, Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos pelo apoio, conhecimento compartilhado, ensinamentos e disponibilidade para auxiliar na condução deste trabalho.

Aos amigos da Embrapa algodão: Eveline Araújo, Taiza Soares, Carliane Rebeca, Valeska Silva, Morganna Pollynne, Vandrê Guevara e Fátima Caetano por todo apoio recebido.

As amigas Silvany e Eveline Araújo, por fazerem de sua casa minha casa nas fases de experimento em Campina Grande-PB.

Aos amigos e colegas do Laboratório de expressão Gênica (LABEG), em especial a Maria Isabel Gomes, Jacqueline Pereira, Yrlânia Guerra e Gerckson Maciel por toda ajuda, companheirismo e conhecimentos adquiridos.

A amiga Maria Isabel Gomes por seu constante apoio na condução dos experimentos, por toda força dada nos momentos mais difíceis e por sua amizade sempre presente.

A amiga Yrlânia Guerra, por ter sido meu braço direito na condução dos experimentos fitopatológicos, por toda paciência e conhecimentos compartilhados.

As minhas amigas de graduação que são apoio sempre presente durante toda caminhada, especialmente Marília Luanda, Adriana Lima, Ivana Souza, Cybelle Oliveira, Eliene Mariano e Ana Karolina.

Aos amigos Patrícia Xavier, Andressa Leite, Patrícia Silva, Bárbara Virginia e Jamilly Lopes por estarem sempre presentes me apoiando e pelos momentos de descontração extra universidade.

A minha família, em especial, a meus pais Gilson José e Ana pessoa e a meus irmãos Beatriz e Diego Veiga por toda paciência e amor acima de tudo.

A Deus, que permitiu que eu pudesse dar cada passo dessa caminhada e que sempre me guiou pelos melhores caminhos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA		Pág.
Figura 1: Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários (LEITE, 2008)		27
Figura 2: Biossíntese simplificada do geraniol (DUBEY et al.,2003)		30
 CAPÍTULO II - Prospection of <i>geraniol synthase</i> in aromatic species to control of cotton ramulosis		
Figure 1. A- amplicons generated from RT-PCR reaction with specific primers <i>GES</i> . B. nylon membrane showing blottings <i>GES</i> generated by alkaline phosphatase labeled probe. M- Marker Ladder 100 bp (Ludwig); 1- <i>R. officinalis</i> ; 2- <i>O. gratissimum</i> ; 3- <i>R. graveolens</i> ; 4- <i>P. boldus</i> ; 5- <i>C. nardus</i> ; 6- <i>P. amboinicus</i> ; 7- <i>J. officinale</i> ; 8- <i>O. majorana</i> ; 9- <i>M. viridis</i> ; 10- <i>M. pulegium</i> ; 11- <i>O. basilicum</i> .		72
Figure 2. Relative expression of <i>GES</i> . Chart generated by the Eco Real-Time PCR System program (Illumina) from data ΔCq and Melt curve, based on the regulation of β -actin.		72
Figure 3. Growth inhibition <i>C. gossypii</i> in PDA containing infusion of fresh leaves (A), fresh extracts (B) and heated dry extract (C) four plant species: ●- <i>Ocimum basilicum</i> L.; + - <i>Mentha pulegium</i> ; ■ - <i>Rosmarinus officinalis</i> e D: ▲- <i>Origanum majorana</i> . Regression equation and R^2 are shown for each sample obtained by the Scott-Knott test 0.05. Coefficients of variation (CV) and F values for the following treatments:A- 1.40 e 117.77; B- 0.88 e 857.70; C- 1.52 e 181.36.		73
Figure 4. <i>C. gossypii</i> of mycelial growth inhibition grown in PDA containing essential oil of 4 species.●- <i>Ocimum basilicum</i> L.; + - <i>Mentha pulegium</i> ; ■ - <i>Rosmarinus officinalis</i> e D: ▲- <i>Origanum majorana</i> . Regression equation and R^2 are shown for each sample obtained by the Scott-Knott test 0.05. Coefficient of variation: 4.47, F:361.40.		74
Figure 5: <i>C. gossypii</i> Inhibition of mycelial growth in PDA medium with different concentrations of essential oils. Treatments: A- <i>Rosmarinus officinalis</i> ; B- <i>Origanum majorana</i> ; C- <i>Ocimum basilicum</i> ; D- <i>Mentha pulegium</i> . Concentrações: 1- Control; 2- 500ppm; 3- 1000ppm; 4- 1500ppm; 5- 2000ppm.		74
 CAPÍTULO III- Effect of kenaf oil on mycelial growth and spores production the <i>colletotrichum gossypii</i> var. <i>Cephalosporioides</i> agent causal of ramulosis in cotton		
Figure 1: Daily Growth Assessment (cm) of <i>C. gossypii</i> amid PDA about Kenaff oil effect at different concentrations. T- Fungus + PDA; T1- fungus + Kenaf 25 μ l/ ml; T2- fungus + Kenaf 50 μ l /ml; T3 - fungus + Kenaf 75 μ l / ml. Regression equation and R^2 is displayed for each concentration.		84
Figure 2: Growth of <i>C. gossypii</i> on PDA on Kenaff oil effect at different concentrations.		85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – Prospection of *geraniol synthase* in aromatic species to control of cotton ramulosis **Pág.**

Table 1. Disease severity indexes in different isolates of *C. gossypii* var. cephalosporioides in plants *Gossypium hirsutum* cultivars 8H. 71

Table 2. Initial Index disease (I.I.D.) and final disease severity index (D.S.I.) in *Gossypium hirsutum* previously treated with vegetable oil and subjected to two local Ramulosis. 75

Table 3. Initial disease index (I.I.D.) and final severity index of disease (D.S.I.) in *gossypium hirsutum* subjected to Ramulosis and curatively treated with vegetable oils in two locations. 76

CAPÍTULO III- Effect of kenaf oil on mycelial growth and spores production the *colletotrichum gossypii* var. Cephalosporioides agent causal of ramulosis in cotton.

Table 1. Parameters phytopathological *C. gossypii* effect on 3 kenaf oil concentrations. 86

LISTA DE ABREVIATURAS

BOD - Biochemical oxygen demand

cDNA- Complementary deoxyribonucleic acid

Cgc- *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa

DNA -Deoxyribonucleic acid

GES- *Geraniol synthase*

ha- hectare

Kb- kilobase

NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Pb- base pair

PCR - Polymerase Chain Reaction

PDA- potato dextrose agar

qPCR - Real time quantitative Polymerase Chain Reaction

RNA - Ribonucleic acid

RT- Reverse transcription

RT-PCR- Reverse transcription polimerase chain reaction

Taq- *Thermus aquaticus*

RESUMO

O algodoeiro destaca-se como uma planta têxtil de alto valor no mercado mundial devido à qualidade de suas fibras e aos derivados comerciais que a planta produz. A ramulose é uma doença que causa grandes danos a esta cultura, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, afeta principalmente folhas jovens, sendo os sintomas mais comuns o escurecimento e necrose das folhas e ramos, podendo comprometer todo o desenvolvimento da planta. Extratos e óleos vegetais vêm sendo estudados como alternativa para controle de pragas e doenças como a ramulose em lavouras. Estes têm como principais constituintes os compostos secundários, substâncias químicas conhecidas como fitoquímicos, terpenóides, alcalóides e glicosídeos. Dentre estes o geraniol, monoterpeneo que destaca-se por sua propriedade fungicida. Já o Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) pertence à família Malvaceae e é rica em compostos conhecidos como polifenóis, alcalóides, taninos e óleos essenciais, também sendo uma promissora fonte de óleo fungicida. Este trabalho buscou analisar o efeito de óleos e extratos sobre o desenvolvimento do fungo *C. gossypii*, causador da ramulose, por meio de duas pesquisas: Na primeira, buscou-se prospectar a *Geraniol synthase*, enzima precursora do geraniol, em espécies aromáticas, por meio de análises moleculares via PCR e qPCR, além de testes fitopatológicos, a fim de avaliar a expressão do geraniol e a eficácia de seus extratos e óleos vegetais na prevenção e no controle da ramulose; Na segunda pesquisa avaliou-se o efeito do óleo de Kenaf sobre o desenvolvimento do fungo *C. gossypii* em condições de laboratório. Para realização da primeira pesquisa onze espécies aromáticas foram avaliadas, entre elas *M. pulegium*, *O. basilicum*, *O. majorana* e *R. officinalis*, as quais apresentaram níveis satisfatório de expressão desta enzima nos ensaios moleculares, sendo selecionadas para bioensaios *in vivo* contra *C. gossypii*. Os óleos de *O. basilicum*, *M. pulegium* e *O. majorana*, na concentração de 2000 ppm, foram testados *in vivo* e suas ações preventivas e curativas comparadas com fungicida comercial. Houve controle efetivo dos óleos *O. basilicum* e *M. pulegium* em condições ambiente, sendo que *M. Pulegium* destacou-se com D.S.I. em torno de 30%, valor menor do que o apresentado pelo fungicida comercial (40%). Esses resultados denotam que o uso de espécies aromáticas pode se constituir numa alternativa eficaz para o tratamento da ramulose, com as vantagens de ser um método de baixo custo e de não fornecer riscos de contaminação ambiental. Além disso, a caracterização genética de espécies aromáticas é uma importante fonte de informações

para ampliar a utilização dos recursos naturais possibilitando que novos materiais detentores de genes de interesse sejam encontrados e sirvam como estratégias de conservação ambiental. Na segunda pesquisa, testes fitopatológicos foram realizados no isolado 287, de *C. gossypii*, sobre o efeito do óleo de Kenaf em concentrações de 25, 50 e 75 $\mu\text{l}/1\text{ml}$. Verificou-se por análise de regressão que não houve redução no crescimento micelial de *C. gossypii* nas concentrações de óleo adotadas neste trabalho. Os dados apresentados pelo crescimento de fungos, efeito fungistático e produção de esporos não revelaram diferença estatística entre o tratamento com óleo e controle. Com base na composição do óleo de kenaf, rica em ingredientes fungicida, mesmo este óleo não apresentando controle sobre *C. gossypii* no presente estudo, acredita-se que em concentrações mais elevadas este óleo possa exercer efeito sobre este patógeno.

Palavras-chaves: Extratos vegetais, fungicida, fitopatógeno.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMO	VIII
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. <i>Gossypium hirsutum</i>	18
2.1.1. Características taxonômicas e reprodutivas:	18
2.1.2. Distribuição geográfica	19
2.1.3. Importância econômica	19
2.2. Doenças do algodão	20
2.3. Uso de agrotóxicos na agricultura	23
2.4. Metabólitos secundários e defesa de plantas	26
2.5. Geraniol	29
2.6. Kenaf (<i>Hibiscus cannabinus</i>)	31
2.7. PCR em tempo real	32
3. REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II- Prospection of <i>geraniol synthase</i> in aromatic species to control of cotton ramulosis	45
<i>Abstract</i>	47
<i>List of abbreviation</i>	48
<i>Introduction</i>	49

<i>Material and methodos</i>	52
Aromatic species and RNA extraction	52
RT-PCR semiquantitative and blotting analises	52
Relative expression of <i>GES</i> transcripts by Real Time	54
Pathogenicity test in isolated <i>Cgc</i>	55
Bioactivity of essential oils and extracts from aromatic species against <i>Cgc</i>	56
Field validation test	57
Statistical analysis	58
<i>Results</i>	59
Semiquantitative and relative expression of GES	59
Pathogenicity test in isolated <i>Cgc</i>	59
Phytotoxicity of extracts and essential oil against <i>Cgc</i>	59
Field validation tests	60
<i>Discussion</i>	61
<i>Conflict of interests</i>	66
<i>References</i>	67
CAPÍTULO III- Effect of kenaf oil on mycelial growth and spores production the <i>colletotrichum gossypii</i> var. <i>Cephalosporioides</i> agent causal of ramulosis in cotton	77
Abstract	78
Introduction	79
Materials and methods	81
Kenaf oil effect on the mycelial growth of <i>C. gossypii</i>	81

Kenaf oil fungicidal effect on <i>C. gossypii</i>	82
Kenaf oil effect the production of spores of <i>C. gossypii</i>	82
Statistical analysis	83
Results and discussion	83
References	87
CAPÍTULO IV – Conclusões gerais	90

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro, família Malvaceae, pertencente ao gênero *Gossypium*, é considerado uma das mais antigas plantas domesticadas pelo homem (RICHETTI e MELO FILHO, 2001). As espécies cultivadas de algodão *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L., *Gossypium arboreum* L. e *Gossypium herbaceum* L. (CRAVEN et. al., 1994), tem elevada importância econômica e social, plantadas em mais de 100 países do mundo. A fibra é seu principal produto, utilizada como matéria-prima para a fabricação de tecidos em mais de 150 países, sendo também importante fonte de óleo e proteínas com larga aplicação em indústrias de alimentos e bicompostíveis (BELTRÃO, 2006).

Apesar do atual crescimento da lavoura algodoeira em nível nacional, o manejo é uma atividade de elevado custo, principalmente nas regiões Sudeste e regiões de cerrados, onde as práticas de mecanização e controle de pragas e doenças, como as doenças fúngicas, oneram em mais de 40% os custos de produção (FREIRE, 2007). Mais de 250 doenças afetam o algodão, 90% delas causadas por fungos que ocorrem em quase todas as regiões produtoras, ocasionando grandes danos econômicos à cultura (CIA e FUZZATO, 1999). A ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, é uma das mais importantes sobre esta cultura no Brasil (CIA e SALGADO, 2005; SUASSUNA e COUTINHO, 2011). Restrita a países da América Latina afeta principalmente folhas jovens, sendo os sintomas mais comuns: escurecimento das folhas e hastes principais e laterais; manchas necróticas circulares no limbo e nervuras; antracnose e tombamento. A doença reduz,

assim, o porte da planta e a produção de capulhos (MATHIESON e MANGANO, 1985).

O uso indiscriminado de agrotóxicos no controle de fitopatógenos e insetos-praga vem causando inúmeros problemas ambientais, como a contaminação de lençóis freáticos e do solo, além de problemas aos agricultores como resistência microbiana adquirida e elevado custo de produção (OOTANI, et al., 2013). O uso de extratos e óleos vegetais podem se constituir numa alternativa para o controle da ramulose. Em seu ambiente natural, os óleos essenciais, produzidos pelas plantas, exercem funções defensivas importantes, incluindo atividade bactericida, antiviral, antifúngica e inseticida (CAMPOS, et al., 2014). Estes têm como principais constituintes os compostos secundários, que são classificados, usualmente, em relação a rota biossintética em compostos fenólicos, terpenos e esteroides e alcaloides (HARBONE, 1999).

Os extratos com atividades repelentes ou atraentes são constituídos principalmente por terpenos e terpenóides (geraniol, sabineno, timol, carvacrol, eugenol e outros) que se apresentam como moléculas voláteis, de baixo peso molecular e bastante diversificadas estruturalmente (KÖKSAL et al., 2011). Estas substâncias são conhecidas como aromáticas e se acumulam em todos os órgãos vegetais, desenvolvendo funções como inibidores de germinação, proteção contra ação de predadores, atração de polinizadores, entre outras (ISMAN, 2006; AQUINO et al., 2010; KNAAK e FIUZA, 2010).

A literatura disponibiliza vários trabalhos fitopatológicos com o uso de óleos essenciais para controle de *Colletotrichum*. No entanto, a grande maioria aborda o controle de *C. gloeosporioides*, agente responsável pela antracnose. Trabalhos reportam

o uso de metabólitos vegetais para controle de *C. gossypii*, Lima *et al.* (2008), mostram que o óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) inibiu o crescimento micelial do *C. gossypii*, com redução de crescimento micelial *in vitro* a 2500 ppm, além de redução no avanço da doença, em casa de vegetação. Óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* e *Baccharis trimera* na concentração 1%, tratamento preventivo *in vivo*, apresentaram efeito na indução de resistência em algodão, reduzindo em 68,9% e 55,1% a ramulose nas plantas tratadas, respectivamente (SANTOS *et al.* 2011).

O Geraniol é um álcool acíclico, monoterpênóide, emitido das flores de variadas espécies de rosas e também presente em tecidos vegetativos de muitas ervas (ANTONELLI *et al.*, 1997.; MALLAVARAPU *et al.*, 1998; RAO *et al.* 2000; MOCKUTE e BERNOTIENE, 1999; VIEIRA *et al.* 2001). É comumente encontrado com os produtos de sua oxidação, o geranial e o neral, estes, em conjunto, formam o citral, composto de cheiro e sabor limão abundante em espécies do gênero *Cymbopogon*, no gengibre e em algumas variedades de manjerição (MIYAZAWA e KAMEOKA, 1988; SINGH-SANGWAN *et al.*, 1993; GRAYER *et al.*, 1996; SIMON *et al.*, 1999). Plantas conhecidas com alto teor de geraniol são raras na natureza, no entanto há muitas espécies desconhecidas geneticamente quanto à presença de genes que codificam para as enzimas responsáveis pela produção de geraniol e outros compostos como eugenol e linalol (YANG *et al.*, 2005). A enzima precursora do geraniol, a *Geraniol Synthase*, tem sequência conservada entre as espécies (YANG *et al.*, 2005), característica importante para realização de prospecção do gene em diversas espécies vegetais.

Além de plantas detentoras de geraniol, outras plantas também podem apresentar potencial para controle de patógenos, kenaf (*Hibiscus cannabinus*), espécie que pertence a família Malvaceae e é nativa de regiões da Índia e África (MOHAMED

et al. , 1995), é sabidamente rica em compostos como polifenóis, alcalóides, taninos e óleos essenciais (AGBOR et al., 2005; KOBAILY et al., 2001), tornando-se uma excelente candidata a fornecer óleo com atividade fungicida. De acordo com Kobaily et al (2001), o óleo essencial de kenaf exerce atividade inibitória sobre o crescimento *in vitro* de *Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides* e *C. accutatum* em concentrações a partir de 100 µg, podendo este óleo ser testado para outras espécies de patógenos e servir como alternativa de controle destes microrganismos.

A genética molecular pode vir a ser uma grande aliada para prospectar espécies com potencial de produção de metabólitos para uso agroecológico. A PCR em tempo real destaca-se entre as técnicas moleculares, permitindo o acompanhamento dos resultados em tempo real e visando além dos resultados qualitativos também a quantificação dos ácidos nucléicos determinando desta forma a quantidade de cópias de uma determinada sequência de nucleotídeos dentro das amostras (HEID et al., 1996). Assim, o estudo das atividades biológicas de compostos secundários vegetais, seja na forma de extrato bruto ou óleo essencial, constitui-se, ao lado da engenharia genética e da indução da resistência, em uma promissora forma de controle de doenças e pragas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2002). No entanto, considerando-se a biodiversidade da flora brasileira, ainda se faz necessários esforços múltiplos para realização de estudos eficazes e aplicados que levem a prospecção e a utilização de bioativos naturais na agricultura, contribuindo para minimizar os elevados custos de produção, reduzir os riscos ambientais e a dependência de fungicidas químicos (RODRIGUEZ e VENDRAMIM, 1997; SINGH et al., 1997; MAZZONETTO e VENDRAMIM, 2003; LIMA, 2008; TIAN, 2011).

O presente trabalho visou prospectar, via ferramentas moleculares e fitopatológicas, a atividade da *Geraniol synthase* em espécies aromáticas, com fins de

investigar o potencial de controle da ramulose em plantas do algodoeiro e com base nos resultados indicar o uso de um ou mais desses materiais em lavouras. Além disso avaliou-se os efeitos do óleo de kenaf (*Hibiscus cannabinus*) sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum gossypii* var. *cephallosporioides*, agente causal desta doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Gossypium hirsutum*

2.1.1. Características taxonômicas e reprodutivas:

O algodoeiro pertence ao grupo das plantas dicotiledôneas, família das malvaceae, a tribo gossypieae e gênero *Gossypium* (CRONQUIST, A. 1981) que compreende cerca de 50 espécies (FRYXEL 1992; PERCIVAL, et al., 1999). As espécies deste gênero são classificadas de acordo com seu nível de ploidia, o número cromossômico básico do gênero *Gossypium* é 13, sendo a espécie cultivada *G. hirsutum* L um tetraplóide genômico ($2n = 4x = 52$) (ENDRIZZI, et al. 1985; STEWART, 1995; WENDEL et al. 2012).

Caracteriza-se por ser uma planta ereta de porte arbustivo, anual ou perene, dotada de raiz principal cônica, pivotante com poucas raízes secundárias grossas e superficiais. O caule herbáceo ou lenhoso tem altura variável sendo dotado de ramos vegetativos e ramos frutíferos (WENDEL e CRONN 2003). As folhas comumente de consistência coriácea são pecioladas, geralmente cordiformes, inteiras ou recortadas apresentando de três a nove lóbulos. As plantas atingem a maturidade reprodutiva com cerca de cinco semanas após o plantio, com a formação dos botões florais. As flores têm ambas as estruturas reprodutivas, feminina e masculina (flores perfeitas), possuindo um terceiro verticilo floral e brácteas, que fazem uma proteção extra, tem coloração creme com antese entre 9 e 10 horas (RITCHIE et al., 2007). Os frutos, denominados de maçãs quando verdes e de capulhos quando se abrem, são capsulares de deiscência longitudinal, tem de três a cinco lóculos, que podem produzir de seis a dez sementes, estas são cobertas por pelos denominados por fibra ou linter (BELTRÃO et al., 2010; SEAGRI, 2012).

2.1.2. Distribuição geográfica

Estudos sugerem que o gênero *Gossypium* originou-se a cerca de 10 a 20 milhões de anos a partir dos *Kokia* e *Gossypoides* os mais próximos dentro da tribo *gossypieae* (WENDEL e ALBERT 1992; SEELANAN et al, 1997). Estas evidências baseiam-se principalmente em análises morfológicas e geográficas, embora a maioria das avaliações sejam baseadas em dados citogenéticos e moleculares (WENDEL et al., 2010).

O centro de origem pra esse gênero ainda não foi determinado, mas os centros de biodiversidade, definidos pelo rico número de espécies, incluem a Austrália, especialmente a região noroeste Kimberley; África (Somália, Djibouti, Eritreia e Etiópia); Sul da Península Arábica e parte centro-oeste e sul do México. As espécies diplóides são originárias de regiões tropicais e subtropicais na África, Ásia, América e Austrália. As espécies alotetraplóides têm sua origem em regiões tropicais e subtropicais nas Américas (FRYXELL, 1992; WENDEL et al., 2010). O centro de origem descrito para o tetraploide *G. hirsutum* são América Central e o México, sendo que o possível centro de domesticação está localizado no sudeste do México, provavelmente na Península de Yucatán durante o período pré-colombiano (BRUBAKER e WENDEL, 1994). As espécies mais cultivadas são *G. hirsutum* e *G. barbadense*, plantadas em mais de 100 países no mundo (SILVA, et al. 2011).

2.1.3. Importância econômica

O algodão (*Gossypium* spp.) é uma importante planta cultivada para a economia de diversos países, fornecendo fibra para indústria têxtil, alimento animal e matéria prima para produção de óleo vegetal a partir de suas sementes. *G. hirsutum* L. é a espécie mais cultivada, responsável por mais de 90% da produção mundial (ALVES et

al., 2009). Estima-se que cerca 350 milhões de pessoas estão ligadas á produção de algodão, desde fazendas até logística, descaroçamento, processamento e embalagem (ABRAPA, 2015).

Em determinados países como Burkina Fasso, Uzbequistão, Mali, Costa do Marfim, Cazaquistão, Egito e Síria o algodão é uma das principais receitas de exportação, sendo a cultura essencial para economia desses países. Brasil, EUA, Uzbekistão e Austrália destacam-se como os principais exportadores de algodão (ABRAPA, 2015). A Conab (2016) estima que a área plantada com algodão na safra de 2015/16 no país equivalerá a 956,7 mil hectares. A cultura do algodoeiro, no estado de Mato Grosso, principal produtor no país nas últimas safras, atingiu níveis de produtividade equivalentes aos melhores do mundo. No ano agrícola 2014/2015 foram cultivados, nesse estado, 562.700 ha com algodoeiro, obtendo-se a produtividade de fibra de 1.638 kg ha⁻¹. Neste ano, a produção de fibra em Mato Grosso correspondeu a 61,58 % da produção brasileira (CONAB, 2016). Fatores como a escolha do genótipo ideal e a interação genótipo ambiente são essenciais para o sucesso da produção algodoeira (SINGH et al. 2007). Além disso, o algodão é uma planta extremamente resistente a seca, possuidora de vários mecanismos de ajustamento, inclusive o osmótico (ALMEIDA, BELTRÃO e GUERRA, 1992; SOUZA, BELTRÃO e SANTOS, 1997; BELTRÃO, AZEVÊDO, NÓBREGA e SANTOS, 1997).

2.2. Doenças do algodão

O algodão é acometido de mais de 250 doenças, sendo 90% delas causadas por fungos que ocorrem em quase todas as regiões produtoras ocasionando danos econômicos a cultura. A grande parte dessas doenças é transmitida via sementes e em potencial as doenças fúngicas. Essas doenças sempre tiveram o foco de especialistas por

provocarem grandes danos a cultura, provocando queda da produtividade e por vezes baixa qualidade do produto (WANG e DAVIS 1997).

A Mancha-de-mirotécio no algodoeiro é causada pelo fungo *Myrothecium roridum* Tode (SUASSUNA et al., 2006), patógeno encontrado em regiões de clima temperado e tropical, numa vasta gama de hospedeiros, que incluem solanáceas e cucurbitáceas (HILLOCKS, 1992). Seus principais sintomas surgem em folhas jovens podendo levar também ao tombamento da plântula, nas plantas adultas causa manchas circulares de coloração escura, com margens violeta-amarronzado e dependendo da severidade pode causar desfolha na planta (BELTRÃO e AZEVEDO, 2008).

A mancha branca ou mancha de ramulária tem como agente causal o fungo *Ramularia aréola*, plantas acometidas por essa doença caracterizam-se por apresentar manchas esbranquiçadas, de formato anguloso em ambas as superfícies foliares pode afetar o algodoeiro ainda precoce e ocasionar queda de folhas, afeta principalmente lavouras desenvolvidas em locais sombreados e úmidos (KIMATI et al., 2005).

Causadas pelos fungos *Alternaria* sp e *Stemphylium solani* as manchas de alternária e estefílium são pequenas manchas circulares de tonalidade marrom no centro e bordas enegrecidas. Quando as lesões envelhecem, o centro torna-se seco e quebradiço, podendo causar perfurações no limbo foliar. Em cultivares suscetíveis, as lesões podem coalescer e formar áreas necróticas irregulares, culminando com a queda das folhas (SUASSUNA et al., 2006; BELTRÃO e AZEVEDO, 2008).

A murcha de fusarium, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* tem como sintomas característicos a murcha das folhas e ramos, plantas jovens podem morrer em poucos dias ao apresentarem sintomas da doença, a maioria das plantas não morre, sobrevivem emitindo novos brotos próximos ao solo, porém estes não são produtivos (DAVIS et al. 2006). Internamente ocorre descoloração dos

feixes vasculares os quais sofrem bloqueio impedindo a livre circulação de água e seiva bruta para a parte aérea, induzindo a murcha.

Dentre todas as doenças descritas para o algodoeiro a ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, é uma das mais importantes (KIMATI et al., 2005). Identificada no Brasil inicialmente no município de Rancharia, em São Paulo (COSTA e FRAGA JR, 1937), encontra-se disseminada por todas as regiões do país onde o algodoeiro é cultivado causando danos nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, em algumas regiões do Nordeste e Paraná, sendo relatada também na Venezuela e Paraguai (CIA e SALGADO, 2005).

Os sintomas aparecem primeiramente nas folhas jovens, são manchas necróticas anelares circulares ou alongadas, o tecido necrosado rompe-se, originando perfurações nas folhas que levam ao crescimento desigual do tecido e enrugamento do limbo foliar. Posteriormente ocorre morte do meristema e conseqüentemente a paralisação do crescimento do ramo o que estimula a brotação de gemas laterais com ramos e entrenós curtos e contorcidos caracterizando o superbrotamento, dependendo do nível de infestação pode levar as plantas ao tombamento, (SUASSUNA e COUTINHO, 2011). Quando ocorre antes do florescimento as estruturas florais abortam afetando o crescimento da planta e a produção de capulhos (SILVA et al. 2010; MELO et al. 2013).

A severidade da ramulose é maior quando ocorre em plantas no início do desenvolvimento vegetativo. Alta pluviosidade e fertilidade do solo, temperaturas entre 25° e 30°C e umidade relativa do ar acima de 80% favorecem a ação do fungo (BELTRÃO e AZEVEDO, 2008). As perdas decorrentes da infestação podem chegar a 80%, dependendo da suscetibilidade da cultivar, há perdas principalmente de produtividade e qualidade das fibras e sementes (FREIRE et. al., 1997). A principal forma de disseminação do patógeno é via semente, seja na forma de conídios ou de

micélios. No solo o fungo pode resistir por cerca de um ano contaminando plântulas que vão servir como fonte de inóculo e propagação da doença (KIMATI et al., 2005).

O manejo para evitar a disseminação dessas doenças envolve práticas de rotação de cultura, tratamento químico de sementes e aplicação de fungicidas, em alguns casos existe a possibilidade do uso de cultivares com algum nível de resistência (SUASSUNA et al., 2006; MORELLO et al., 2010; KIMATI et al., 2005).

2.3. Uso de agrotóxicos na agricultura

No decorrer dos anos, com o crescimento populacional, deu-se também o desenvolvimento agrícola decorrente da necessidade de aumento da demanda alimentar. Com isso, campos de cultivo foram invadidos por uma gama de insetos e roedores além de acometidos por doenças causadas por fungos e bactérias. Essas espécies multiplicaram-se rapidamente causando danos as lavouras e reduzindo a produtividade (BARBOSA, 2004). Para combate e controle dessas pragas o homem recorreu ao uso de substâncias químicas chamadas de agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas e ou veneno dentre outras denominações (PERES e MOREIRA, 2003).

Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), agrotóxicos são qualquer substância ou combinação de substâncias utilizadas para controlar, prevenir e destruir pragas que incluem desde plantas invasoras a animais e microrganismos que causem danos a lavouras (PERES e MOREIRA, 2003). De acordo com a lei nº 7.802, o termo agrotóxico e afins é definido como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso no setor de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da

ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (LARINI, 1999; ANDREI, 2005).

Os defensivos agrícolas tornaram-se a principal ferramenta para controlar pragas e doenças nas lavouras, a constante necessidade de aumento da produtividade faz com que o mercado desses defensivos cresça constantemente. Estes são usualmente classificados como: inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (combate às plantas invasoras), fumigantes (combate às bactérias do solo), algicidas (combate a algas), avicidas (combate a aves), nematicidas (combate aos nematoides), moluscicidas (combate aos moluscos), acaricidas (combate aos ácaros), reguladores de crescimento, desfoliantes (combate às folhas indesejadas) e dissecentes (SILVA e FAY, 2004; BAIRD, 2006). Podem ser classificados ainda de acordo com a sua composição e estrutura química e quanto aos efeitos a saúde humana que leva em consideração seu grau de toxicidade relacionado com a Dose Letal 50 (DL50).

Os defensivos são utilizados desde a segunda metade do século XIX, sendo que os primeiros foram fungicidas como cobre, enxofre, nicotina e piretrinas entre outros, a partir dos anos de 1930 uma série de inovações ocorreram dando-se início a testes e análises de interações biológicas desses produtos (SALLES FILHO, 1993). Assim no decorrer das décadas surgiram inúmeros novos produtos dentre fungicidas, herbicidas, inseticidas e outros. A indústria química evoluiu e a diversidade de defensivos ficou cada vez maior, porém suas consequências para a natureza e para o homem não foram levadas em consideração diante da necessidade de se produzir mais alimentos para uma população em constante crescimento (ABREU JÚNIOR, 1998).

Em meados da década de 1960 surgiram os primeiros indícios de que o uso dessas substâncias no cenário agrícola vinha causando inúmeros danos ao meio

ambiente. Pesquisas provaram que o meio ambiente armazenava os produtos lançados nas lavouras, então produtos de difícil degradação como o DDT (diclorodifeniltricloroetano) acumulam-se no solo e lençóis freáticos entrando na cadeia alimentar causando danos a plantas, animais e inclusive ao homem (PASCHOAL, 1979).

O desequilíbrio biológico também é uma consequência do uso indiscriminado de agrotóxicos, resulta do fato de que os agrotóxicos por muitas vezes são bem mais prejudiciais aos inimigos naturais do que as próprias pragas em si. Isso acontece, por exemplo, pelo uso de inseticidas não seletivos, quando estes produtos são aplicados ocorre uma mortandade bem maior de predadores e parasitas do que das pragas, isso porque esses predadores estão num nível trófico mais elevado e conseqüentemente em menor número (PASCHOAL, 1979). Outro fator que contribui pra esse desequilíbrio é a resistência genética adquirida por essas pragas aos produtos químicos geração após geração, fato que ocorre devido ao grande número de indivíduos nas populações de pragas que aumenta a probabilidade de sobrevivência de um indivíduo portador de genes para resistência.

Assim, os agrotóxicos fazem parte uma classe de compostos orgânicos formados por substâncias químicas potencialmente tóxicas aos seres humanos e ao ambiente. Inúmeros destes compostos possuem hidrofobicidade elevada e juntamente com a falta de uma via eficiente de degradação dos resíduos se acumulam no ambiente e em organismos vivos como seres humanos, peixes, gados e outros animais. Esses fatores tem aumentado a fiscalização e o estabelecimento de regulamentações e limites máximos de resíduos (LMR) em alimentos por governos de diversos países visando garantir a segurança do consumidor e dos produtores (JARDIM e ANDRADE 2009).

Diante dos inúmeros problemas causados pelo uso de agrotóxicos uma série de conceitos de alimentação saudável, juntamente com a busca constante por alternativas que combatam as pragas e causem menos danos ao meio ambiente trouxeram a tona o conceito de agricultura ecologicamente correta, segmento que busca reduzir o uso de agrotóxicos sintéticos nas lavouras com o uso de novas tecnologias que visam, além do aumento da produtividade, a qualidade do produto e a preservação ambiental (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003).

2.4. Metabólitos secundários e defesa de plantas

As plantas tem um metabolismo complexo e dele resultam uma série de substâncias químicas denominadas metabólitos secundários, estes são conhecidos como fitoquímicos, terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos e glicosídeos entre outros (BOSCOLO e VALLE, 2008; SOUZA, 2015). Os metabólitos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são essenciais para sua adaptação em diferentes ecossistemas. Esses metabólitos são responsáveis por diversas atividades biológicas podendo atuar como antifúngicos, bactericidas e antivirais, bem como protegendo as plantas contra o ataque de insetos ou de herbívoros, também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas ou atuar atraindo alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes (AERTS et al., 1991; FUMAGALI, et al 2008; MAREI et al. 2012).

Estes compostos são sintetizados por todas as partes das plantas, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008). Metabólitos secundários tem como precursores alguns metabólitos primários, há três principais precursores dos metabólitos secundários: ácido

chiquímico (precursor de vários compostos aromáticos), acetato (precursor de ácidos graxos, polifenóis, isoprenos, prostaglandinas etc.) e aminoácidos (biossíntese de alcalóides) como representado a figura 1 (HARBONE, 1999; BAKKALI et al., 2008).

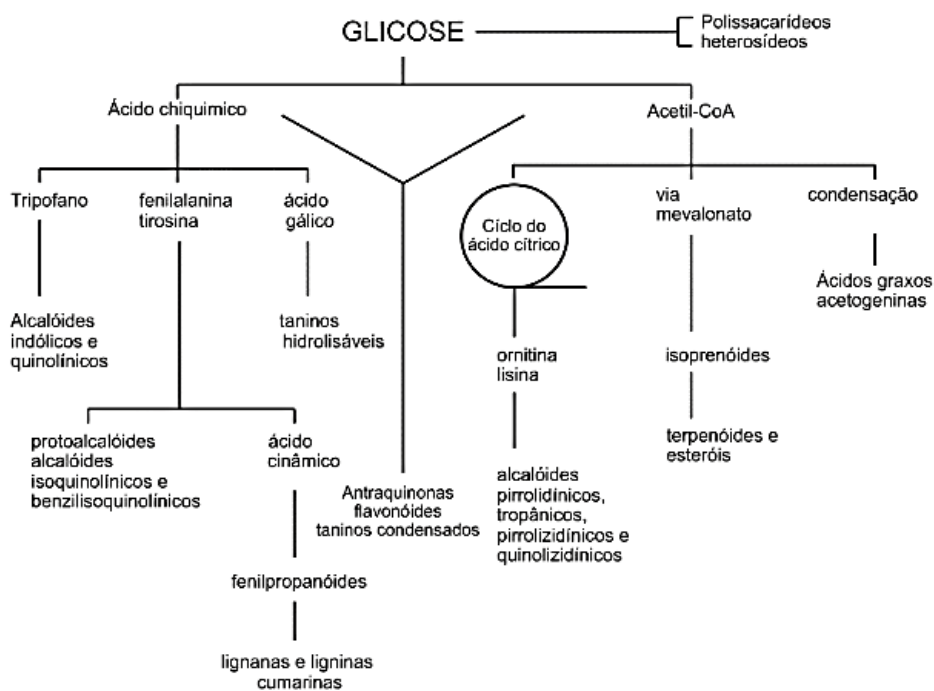


Figura 1: Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários (LEITE, 2008).

Os compostos fenólicos têm função ligada a síntese de ligninas, estas são produzidas por todas as plantas superiores e são responsáveis pelo odor, coloração e sabor agradável que atrai animais e insetos que promovem a polinização e a dispersão de sementes. Outra propriedade desse grupo é a ação alelopática e também a capacidade de proteger as plantas do ataque de pragas e patógenos e da ação dos raios ultravioleta (CROTEAU et al., 2000). Já os alcalóides, constituídos por pelo menos um átomo de nitrogênio no anel heterocíclico, agrupam compostos farmacologicamente ativos restritos a alguns gêneros e espécies vegetais (CORDELL, 1981). Essas substâncias

podem causar uma gama de efeitos fisiológicos nos animais sendo tóxicos a insetos e herbívoros (CROTEAU et al. 2000).

O grupo terpênico é normalmente constituída de moléculas de dez e de quinze carbonos (monoterpenos e sesquiterpenos) (DUBEY et al., 2003). As moléculas de monoterpenos representam 90% da composição dos óleos essenciais e são classificados em dois grupos, monoterpenos oxigenados e monoterpenos hidrocarbonetos (BAKKALI et al., 2008). Os monoterpenos tem propriedades inseticida, bactericida e fungicida naturais que os tornam a principal alternativa para controle de pragas e patógenos em lavouras. Muitos trabalhos relatam estas atividades pesticidas e inseticidas (ISMAN et al, 2000), herbicida (DUKE et al, 2001; SINGH et al, 2002) , fungicida (WURYATMO et al, 2003; CÄRDENAS-ORTEGA et al 2005) e bactericida (CRISTANI et al, 2007) relacionadas a monoterpenos.

Os óleos essenciais são líquidos oleosos voláteis com aroma agradável, presente em inúmeras espécies vegetais. Estes óleos são normalmente elaborados por células glandulares isoladas ou por pêlos glandulares, encontrados nas folhas (BONNER, 1961), sendo armazenados em espaços extracelulares entre a cutícula e a parede celular (TAIZ & ZEIGER, 2004) são compostos basicamente pelos terpenos sintetizados pela rota do mevalonato (SIMON, 1999).

A procura por novos compostos de origem vegetal na forma de extratos ou óleos essenciais tem sido cada vez mais intensa (PRAKASH, 2012), estes vem sendo utilizados para estudos *in vitro* de inibição de crescimento micelial e esporulação de fungos fitopatogênicos (*R. solani*, *S. rolfsii*, *A. alternata*, *Phytophthora* sp. e *C. graminicola*). Plantas como: alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), babosa (*Aloe vera* L.), mil-folhas (*Achillea millefolium* L.), orégano (*Origanum vulgare*

L.), cardo santo (*Argemone mexicana* L.), pitanga (*Stenocalyx michelli* L.), erva cidreira (*Lippia alba* L.), poejo (*Mentha pulegium* L.), hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.), romã (*Punica granatum* L.), goiabeira vermelha (*Psidium guayava* L. var. *pomifera*), eucalipto citriodora, manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), arruda (*Ruta graveolens* L.) e carqueja (*Baccharis trimera* (Lees.) DC) tem apresentado resultados satisfatórios no controle de patógenos em diversos trabalhos (SCHWAN-ESTRADA, 2002).

2.5. Geraniol

O Geraniol ((E)-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) ($C_{10}H_{18}O$) é um álcool acíclico, monoterpênóide, emitido das flores de variadas espécies de rosas e também presente em tecidos vegetativos de muitas ervas (ANTONELLI et al, 1997.; MALLAVARAPU et al., 1998; RAO et al. 2000; MOCKUTE e BERNOTIENE, 1999; VIEIRA et al. 2001). É comumente encontrado com os produtos de sua oxidação, o geranial e o neral, estes, em conjunto, formam o citral, composto de cheiro e sabor limão abundante em espécies do gênero *Cymbopogon*, no gengibre e em algumas variedades de manjeriço (MIYAZAWA e KAMEOKA, 1988; SINGH-SANGWAN et al., 1993; GRAYER et al., 1996; SIMON et al., 1999; IJIMA et al., 2004). Ele é encontrado em glândulas e canais secretores, tricomas glandulares e estruturas secretoras especializadas. Na maioria das plantas o geraniol é biossintetizado pela via metabólica do pirofosfato de geranila (GPP), através da condensação cabeça-cauda dos pirofosfatos de isopentenila (IPP) e dimetilalila (DMAPP) (Figura 2) (DUBEY et al., 2001; DUBEY et al., 2003; CHEN e VILJOEN, 2010).

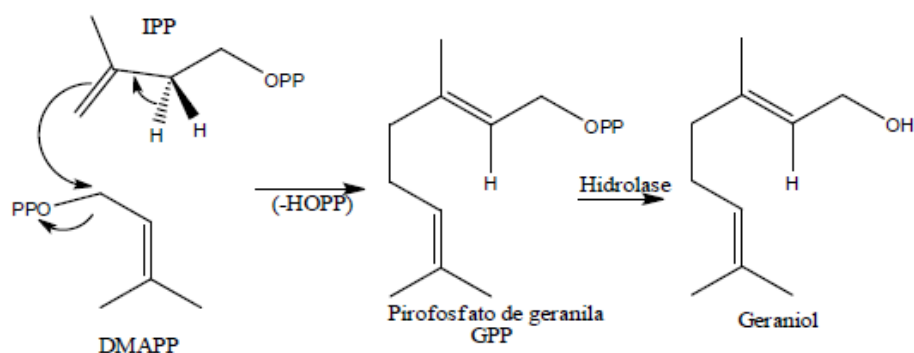


Figura 2: Biossíntese simplificada do geraniol (DUBEY et al., 2003).

O geraniol tem eficácia conhecida como repelente de mosquitos, inseticida e herbicida. Devido ao forte odor também é frequentemente utilizado em indústrias de cosméticos, materiais de limpeza e alimentícias, além de ser usado nas indústrias farmacêuticas por auxiliar na absorção de alguns medicamentos pelo organismo (CHEN e VILJOEN, 2010). Destaca-se como um dos principais componentes de óleos fungicidas em diversos trabalhos. Aguiar-menezes, (2005) detectaram o geraniol entre os principais componentes do óleo essencial da citronela (*C. nardus*), gramínea aromática considerada excelente repelente contra mosquitos e borrachudos, em decorrência dos altos teores de geraniol e citronelal presentes em seu óleo essencial. Ensaio em laboratório realizados por Bastos e Silva, (2002) mostraram que o óleo essencial dessa gramínea inibiu em 100 % o crescimento micelial e a esporulação de *Crinipellis pernicioso*, agente causador da vassoura-de-bruxa do cacauero. Resultados semelhantes foram alcançados com óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, que de acordo com a literatura também possui geraniol em sua composição e que inibiu totalmente o crescimento micelial *in vitro* dos fungos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp. e *Alternaria alternata* (BENINI et al., 2010). Esses álcoois agem alterando a permeabilidade da membrana plasmática dos organismos inibindo o

processo de respiração celular dos fungos (COX et al, 2000; DEBA et al, 2008; IMELOUANE et al, 2009) .

2.6. Kenaf (*Hibiscus cannabinus*)

Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) é uma importante fibrosa pertencente a família Malvaceae e ao gênero *Hibiscus* (CRAVEN et al., 2003; DANALATOS e ARCHONTOULIS, 2010). Cultivada no Egito há cerca de 6000 A.C, tem como centro de origem o continente africano e atualmente é cultivada em países como a China, Tailândia, Índia e Estados Unidos. Muito importante para indústria têxtil por fornecer fibras em grande quantidade e de alta resistência, as quais são utilizadas na confecção de tapetes, cordas, bolsas, papel, entre outros produtos. Além dessas utilidades o kenaf pode ainda ser usado como fonte alimentar e fonte de óleo vegetal (BARBOSA, 2010).

É uma planta de porte herbáceo, de ciclo curto que pode atingir cerca de 3,0m de altura, suas folhas são polimórficas de 10 a 15 cm de comprimento. As flores atingem de 8 a 15 cm de diâmetro de cores branco amarelado ou roxo. O fruto é uma cápsula de 2 cm de diâmetro, com várias sementes. As sementes são pequenas, de cor escura e de forma aproximadamente triangular (BARBOSA, 2010).

As sementes de Kenaf apresentam teor de óleo de cerca de 20% (WEBBER e BLEDSOE, 2002; MARACCHI, 2007). Este óleo pode ser utilizado na alimentação humana e os seus ácidos gordos maioritários são o palmítico (20%), o oleico (29%) e o linoleico (46%) (WEBBER e BLEDSOE, 2002). Este óleo pode ainda ser usado na produção de energia, sabões, tintas e vernizes e para iluminação (ALEXOPOULOU, 2003; CATROGA, 2009).

Além da semente, é possível também extrair óleo de outras partes da planta como as folhas, sendo esta sabidamente rica em compostos como polifenóis, alcalóides, taninos e óleos essenciais (AGBOR et al., 2005; KOBALSY et al., 2001). Seu óleo vem sendo amplamente estudado quanto a seu efeito alelopático, efeito identificado inicialmente pela população reduzida de ervas daninhas em torno de exemplares desta espécie (RUSSO et al., 1997). Estes estudos relatam redução da germinação de sementes de espécies como *Amaranthus retroflexus* L., *Lolium multiflorum* Lam., *Lycopersicon esculentum* Mill. e *Cucumis sativus* L. sobre efeito de extratos e óleos desta planta (RUSSO et al., 1997; WEBBER et al., 2000). No entanto, de acordo com Kobaisy et al (2001), o óleo essencial de kenaf também exerce atividade inibitória sobre o crescimento *in vitro* de *Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* em concentrações a partir de 100 µg, podendo este óleo ser testado para outras espécies de patógenos e servir como alternativa de controle destes microrganismos.

2.7. PCR em tempo real

Um dos grandes passos nas pesquisas biológicas foi o uso de técnicas moleculares a partir no século XX, dentre essas técnicas a reação da polimerase em cadeia (PCR) veio acompanhada de inúmeros benefícios e grandes passos no ramo das ciências biológicas como a detecção da expressão de genes, o sequenciamento de genomas e o diagnóstico rápido de doenças.

A partir da PCR foi desenvolvida a técnica de qPCR buscando estimar o número de cópias de um gene de interesse (DOLKEN et al., 1998; HIGUCHI et al., 1993). Dentre as vantagens desta técnica em relação à PCR convencional estão a facilidade na quantificação, maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, além da velocidade na análise e controle da qualidade do processo. Desta forma, a possibilidade

de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA, a técnica baseia-se na emissão de fluorescência que aumenta seu sinal conforme a quantidade de amplificações do produto da PCR (PIRES-ALVES & NOVAIS, 2004).

Esta variação da PCR convencional permite o acompanhamento dos resultados em tempo real visando além dos resultados qualitativos também a quantificação dos ácidos nucléicos determinando desta forma a quantidade de cópias de uma determinada sequência de nucleotídeos dentro das amostras (HEID et al., 1996). A quantificação de ácidos nucléicos via qPCR é precisa e tem grande reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial da reação. O CT (Cycle Threshold) é uma medida relativa da concentração de DNA alvo na reação de qPCR (Applied Biosystems), este ponto possibilita a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência, os valores do sinal emitido pelos compostos fluorescentes são armazenados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (LACAVA & AZEVEDO, 2008). Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR® Green e TaqMan® (BOECKMAN et al., 2000).

3. REFERÊNCIAS

- ABRAPA (Associação brasileira dos produtores de algodão), Algodão no mundo Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/Algodao-no-Mundo.aspx>. Acesso em: 20/05/2016.
- ABREU JUNIOR, H. de. Práticas alternativas de controle de pragas e doenças na agricultura: Coletânea de receitas. Campinas, **EMOPI**, 1998, 11 5p.
- AERTS, R.J, SNOEIJER, W., VAN, D.E.R., MEIJDEN, E. and VERPOORTE R. Allelopathic inhibition of seed germination by *Cinchona* alkaloids. **Phytochemistry** 30: 2947-2951. 1991.
- AGBOR G.A., OBEN J.E., NGOGANG J.Y. Haematinic activity of *Hibiscus cannabinus*. **Afr. J. Biotechnol.**, 4(8): 833-837. 2005.
- AGUIAR-MENEZES, E.L. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, p. 58, Brasília, 2005.
- ALEXOPOULOU, E. Literature review, Biokenaf Project, Athens, Greece, 2003.
- ALMEIDA, O. A.; BELTRÃO, N. E. M. e GUERRA, H. O. C. Crescimento, desenvolvimento e produção do algodoeiro herbáceo em condições de anoxia do meio edáfico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 9, p. 1259-1272. 1992.
- ALVES, M.F., PEREIRA, F.R.A., ANDRADE, A.M., MENEZES, I.P.P., HOFFMANN, L.V. e BARROSO, P.A.V. Marcadores moleculares polimórficos entre algodoeiros mocós e herbáceos. **Rev Cienc Agron.** 40: 406-411. 2009.
- ANDREI, E. (Coord.). Compêndio de defensivos agrícolas. 7.ed. São Paulo: Andrei, 2005.
- ANTONELLI, A.; FABBRI, C.; GIORGIONI, M.E.; BAZZOCCHI, R. Characterization of 24 old garden roses from their volatile compositions. **J Agric Food Chem.** 45: 4435-4439,1997.
- AQUINO, L. C. L., SANTOS, G. G., TRINDADE, R. C., ALVES, J. A. B., SANTOS, P. O., ALVES, P. B., BLANK, A. F. e CARVALHO, L. M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. **Alim. Nutr.**, v. 21, n. 4, p. 529-535, out./dez. 2010.
- BAIRD, C. Chemistry in your life. 2. ed. New York: W. H. Freeman, 2006.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2008.
- BARBOSA, B.M.G. Utilização de Águas Residuais Tratadas na Irrigação de Kenaf (*Hibiscus Cannabinus L.*) - Efeito do ion amônio. Dissertação apresentada na Faculdade

de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Energia e Bioenergia. Monte da Caparica, 101 p. 2010.

BARBOSA, L.C.A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Minas Gerais: Ed. UFV, 2004.

BASTOS, C.N. e SILVA, D.M.H. Inibição micelial de fungos fitopatógenos através de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *P. marginatum*. **Fitopatologia Brasileira**, 27 (Supl.):82. 2002.

BELTRÃO, N. E. de M. Fisiologia da produção do algodoeiro. Campina Grande: **Embrapa Algodão**, (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 94). 2006.

BELTRÃO, N. E. DE M., AZEVEDO, D. M. P. de. Contribuição do melhoramento ao cultivado algodão. In.: Beltrão, N. E. de M.; Azevedo, D. M. P. de. (Eds.). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília- DF: Embrapa Algodão, 2008. v.1, p.271-279.

BELTRÃO, N. E. de M ; AZEVEDO , D. M . P. de, NÓBREGA, L. B. da, SANTOS , J . W. dos S. Modificações no crescimento e desenvolvimento do algodoeiro herbáceo sob saturação hídrica do substrato em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32 ,n. 4 , p. 391- 397 , abr. 1997.

BELTRÃO, N. E. DE M.; VALE, L. S. DO; MARQUES, L. F.; CARDOSO, G. D.; SOUTO, J. S. Consórcio mamona e amendoim: opção para a agricultura familiar. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.5, p.222-227, 2010.

BOECKMAN, F., HAMBY, K. and TAN, L. Real-time PCR using the iCycler iQ detection system and intercalation dyes. Application note 2567, Bio-Rad Laboratories, **Alfred Nobel Drive**, Hercules, CA 94547, USA. 2000.

BONNER, J. The isoprenoids. In: Bonner, J.; Verner, J. E. (Ed.) *Plant biochemistry*, New York: **Academic Press**, 1961. p.665-692.

BOSCOLO, O.H. e VALLE, L.S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, v. 63, n. 2, p. 263-277, 2008.

BRUBAKER, C. L. and WENDEL, J. F.. Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). **American Journal of Botany**, 81:1309-1326. 1994.

CAMPANHOLA, C., BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (ed.). Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna> **Embrapa Meio Ambiente**, P. 13-51, 2003.

CAMPOS, F. G., BARON, D., MARQUES, M.O.M., FERREIRA, G., BOARO, C. S. F. Characterization of the chemical composition of the essential oils from *Annona emarginata*(Schltdl.) H. Rainer 'terra-fria' and *Annona squamosa* L. **Rev. Bras. Frutic.** vol.36, 2014.

CÁRDENAS-ORTEGA N., ZAVALA-SÁNCHEZ M., AGUIRRERIVERA J., PÉREZ-GONZALEZ C., PÉREZ-GUTIÉRREZ S., 2005.- Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray.- *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (11): 4347-4349.

CATROGA, A. M. D. Contributo para o estudo das potencialidades do Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) na fitorremediação de solos contaminados com metais pesados. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do Grau de Mestre em Bioenergia. Lisboa, 104 p. 2009.

CHEN, W. e VILJOEN, A.M. Geraniol — A review of a commercially importante fragrance material. **South African Journal of Botany.**, v. 76, p. 643–651,2010.

CIA, E e FUZZATO, M.G. Manejo de doenças na cultura do algodão. In: CIA, E.; FREIRE, E.C., SANTOS. W.J. (Ed) **Cultura do algodoeiro**, Piracicaba: Potafos, 1999. P. 121-131.

CIA, E. e SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. e REZENDE, J.A.M. (ed.) *Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. 4 ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, v.2, p. 47-48, 2005.

Conab Monitoramento agrícola – Cultivos de inverno (safra 2015) e de verão (safra 2015/16). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em Janeiro 2016.

CORDELL, G.A. Introduction to alkaloids: A Biogenetic approach. Nova York: **John-Wiley & Sons**, p. 208. 1981.

COSTA, A.S., FRAGA JUNIOR, C.G. Superbrotamento ou Ramulose do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, v.7, p.249-259. 1937.

COX, G.M, MUKHERJEE, J., COLE, G.T., CASADEVALL, A. and PERFECT, J.R. Urease as a virulence factor in experimental *cryptococcosis*. **Infect. Immun.** 68:443–448. 2000.

CRAVEN, L.A, M.C.D. STEWART., BROWN, A. H. D., GRACE, J.P. The Australian wild species of *Gossypium*. In: PROCEEDINGS OF THE WORLD COTTON RESEARCH CONFERENCE, 1. 1994, Brisbane, Australia. **Challenging the future**. p. 278 – 281 , 1994.

- CRAVEN, L. A., WILSON, F. D. and FRYXELL, P. A. A taxonomic review of *Hibiscus* section *Furcaria* (Malvaceae) in Western Australia and the Northern Territory. *Austral. Syst. Bot.* 16:185–218. 2003.
- CRISTANI, M., MENEZES, C., GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., SPANEVELLO, R., SILVEIRA, A., GONÇALVES, F.F., ZANELLA, R. and LORO, V.L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere.* 67, 2305-2311. 2007.
- CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York: Columbia University Press. 1981.
- CROTEAU, R., KUTCAHN, T.M. e LEWIS, N.G. Natural products. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Grissem, W. and Jones, R., eds). Rockville, MD: **American Society of Plant Physiologists**, pp. 1250–1318. 2000.
- DANALATOS N.G. and ARCHONTOULIS, S.V. Growth and biomass productivity of kenaf (*Hibiscus cannabinus*, L.) under different agricultural inputs and management practices in central Greece. **Industrial Crops and Products** 32:231–240. 2010.
- DAVIS, R.M., P.D. COLYER, C.S. ROTHROCK, e J.K. KOCHMAN. *Fusarium* wilt of cotton: Population diversity and implications for management. **Plant Dis.**90: 692-703. 2006.
- DEBA, F. et al. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. **Food Control**, v.19, ed.4, p.346-352, apr. 2008.
- DOLKEN, L., SCHULER, F. e DOLKEN, G. Quantitative detection of t(14;18)-positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. **Biotechniques** 25:1058. 1998
- DUBEY, V.S., BHALLA, R., e LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **J. Biosci.**, 28, 637–646, 2003.
- DUBEY V. S. e LUTHRA R. Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii* Roxb. Wats var. *motia*) inflorescence development. **Phytochemistry** 57, 675 – 680. 2001.
- DUKE, S.O, SCHEFFLER, B.E, DAYAN, F.E, WESTON, L.A., OTA, E. Strategies for using transgenes to produce allelopathic crops. **Weed Technology** , v.15, p.826–834, 2001.
- ENDRIZZI, J.E., TURCOTTE, E.L., e KOHEL, R.J. Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium*. **Adv Genet** 23:271–375. 1985.

FUMAGALI, E., APARECIDA, R., GONÇALVES, C., FÁTIMA M., VIDOTI, G., DE OLIVEIRA A., J. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(4): 627-641, Out./Dez. 2008.

FREIRE, E.C. Algodão no Cerrado do Brasil. Brasília: **Associação Brasileira dos Produtores de Algodão**, 2007.

FREIRE, E. C., SOARES, J. J., FARIAS, F. J. C., ARANTES, E. M., ANDRADE, F. P., PARO, H., LACA-BUENDIA, J. P. Cultura do algodoeiro no estado de Mato Grosso. Campina Grande-PB: **Embrapa Algodão**, 1997, 65 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica 23).

FRYXELL P. A. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). **Rheedea** 2: 108–165. 1992.

GRAYER, R.J., KITE, G.C., GOLDSTONE, F.J., BRYAN, S.E., PATON A, PUTIEVSKY E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, 43: 1033–1039, 1996.

HARBORNE, J.B. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products. **London: Imperial College**, p.1-25. 1999.

HEID, CA et al. Real Time Quantitative PCR. **Genome Methods**. 986-994. 1996.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. e WATSON R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology** (N Y), 11:1026–1030. 1993.

HILLOCKS, R. J. (Ed.). Cotton Diseases. Wallingford: **CAB International**, p. 1-38. 1992.

IJIMA, Y., GANG, D.R, FRIDMAN, E., LEWINSOHN, E. e PICHERSKY, E. Characterization of *Geraniol Synthase* from the Peltate Glands of Sweet Basil. **Plant Physiol**. 134. 2004.

IMELOUANE, B., AMHAMDI, B., WATHELET, J.P., ANKIT M., KHEDID, K. e EL, A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. **Int J Agr Biol**, 11, pp. 205–208. 2009.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v.19, p.603-8, 2000.

ISMAN, M.B. The role of botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annu. Rev. Entomol.**, v.51, p.51-66, 2006.

JARDIM, I.C.S.F. e ANDRADE, J.A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

KIMATI, H. et al. Manual de fitopatologia. 4. ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 2005. v. 2, 623 p.

KNAAK, N., FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v.5, p.120-132, 2010.

KOBAISY M., TELLEZ M. R., WEBBER C. L., DAYAN F. E.; SCHRADER K. K. e WEDGE, D. E. Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. **Journal Agriculture Food Chemistry**. vol. 49. nº 8. pp. 3768 – 3771. 2001.

KÖKSAL, M., HU, H., COATES, R. M., PETERS, R.J., CHRISTIANSON, D.W. Structure and mechanism of the diterpene cyclase ent-copalyl diphosphate synthase. **Nat Chem Biol**, 7: 431–433,2011.

LACAVAL, P.T. e AZEVEDO, J.L. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo de ecologia microbiana. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds) **Microbiologia Ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, Brasil, p. 107-124. 2008.

LARINI, L. Toxicidade dos praguicidas. In: _____. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999. Cap. 2, p.9-18.

LEITE, J. P. V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. 1.Ed. São Paulo: Atheneu. 2008.

LIMA, W. G. Controle alternativo da ramulose do algodoeiro via utilização de óleos essenciais. **Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 89f. 2008.

MALLAVARAPU, G.R., RAO, B.R.R., KAUL, P.N., RAMESH, S., BHATTACHARYA, A.K. Volatile constituents of the essential oils of the seeds and the herb of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia Burk.). **Flavour Fragr** 13: 167 169.1998.

MARACCHI, G. Manuale di coltivazione e prima lavorazione del lino e altre piante da fibra. Regione Toscana : Ricerca trasferimento innovazione - Settore delle politiche regionali dell'innovazione e della ricerca, 2007.

MAREI, G., RASOUL, M.A.A., ABDELGALEIL, S.A.M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pestic Biochem Physiol** 103:56-61. 2012.

MATHIESON, J.T. e MANGANO, V. Ramulose, a new cotton diseases in Paraguay caused by *Colletotrichum gossypii* var. cephalosporioides. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 11, n.1/2, p. 115-118, jan/jun 1985.

MAZZONETTO, F., VENDRAMIM, J.D. Efeito de substâncias de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleptera: Bruchidae) em feijão armazenado. **Neotropical Entomology**, ESALQ/USP, v.32, n.1, p. 145-149, 2003.

MELO, R.M.C.A., MELO- FILHO, P.A., CÂMARA, M.P.S., LIMA W.G. & SANTOS, R.C. Preventive control of cotton ramulosis using clove oil at low concentration. **International Journal of Agricultural Science Research**, 2(3), pp. 060-066.2013.

MIYAZAWA, M., KAMEOKA, H. Volatile flavor components of *Zingiberis rhizoma* (*Zingiber officinale* Roscoe). **Agric Biol Chem** ,52: 2961–2963. 1988.

MOCKUTE, D. e BERNOTIENE, G. The main citral-geraniol and carvacrol chemotypes of the essential oil of *Thymus pulegioides* L. growing wild in Vilnius district (Lithuania). **J Agric Food Chem** 47: 3787–3790.1999.

MOHAMED A., BHARDWAJ H., HAMAMA A. and WEBBER, C. Chemical composition of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil. **Industrial Crops and Products**. 4: 157–165. 1995.

MOREIRA, C.G.A., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., BONALDO, S.M., STANGARLIN, J.R., CRUZ, M.E.S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium* **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.332-337, 2008.

MORELLO, C.L., SUASSUNA, N.D., FARIAS, F.J.C., LAMAS, F.M., PEDROSA, M.B., RIBEIRO, J.L., GODINHO, V.P.C. and FREIRE, E.C. BRS 293: A midseason highyielding upland cotton cultivar for Brazilian savanna. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 10: 180-182. 2010.

PIRES-ALVES, M., NOVAIS, C.M., SILVA, F.F. PCR em tempo real. **Rev.Biotecnol. Cienc. Des.** ed. 33. 2004.

OOTANI, M. A., AGUIAR, R. W., RAMOS, A.C. C., BRITO, D. R., SILVA, J. B., CAJAZEIRA, J. P.. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 4, N.2: pp. 162-174, May 2013.

PASCHOAL, A. Pragas, Praguicidas e a Crise Ambiental: problemas e soluções. Rio de Janeiro, Ed. FGV. 1979. 102 p.

PERCIVAL, A.E., STEWART, J.M. e WENDEL J.F. Taxonomy and germplasm resources. In: C.W. Smith and J.T. Cothren, editors, Cotton, origin, history, technology and production. **John Wiley and Sons**, New York. p. 33–63. 1999.

PERES, F e MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PRAKASH, B., SINGH, P., KEDIA, A., SINGH, A. e DUBEY, N.K. Efficacy of essential oil combination of *curcuma longa* L. and *zingiber officinale* rosc. as a postharvest fungitoxicant, aflatoxin inhibitor and antioxidant agent, **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 3, p. 279-288, 2012.

RAO, B.R.R., SASTRY, K.P., SALEEM, S.M., RAO, E.V.S.P., SYAMASUNDAR, K.V., RAMESH, S. Volatile flower oils of three genotypes of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.). **Flavour Fragr J**, 15: 105–107. 2000.

RITCHIE, G. L., BEDNARZ, C. W., JOST, P. H., BROWN, S. M. Cotton Growth and Development. University of Georgia: **Cooperative Extension. Bulletin** 1252, revised June, 2007.

RICHETTI, A., MELO FILHO, G.A. Aspectos econômicos do algodoeiro. In: ALGODÃO: TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO. Campo Grande: Embrapa Agropecuária Oeste, Campina Grande: **Embrapa Algodão**, 2001. p.13-34.

RODRÍGUEZ, H. C., VENDRAMIM, J. D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista da Agricultura**, Piracicaba, v. 72, p. 305-318, 1997.

RUSSO, V.M., WEBBER, C.L. III, and MYERS, D.L.. Germination and post-germination development of vegetable, grass and weed exposed to kenaf extracts. **Ind. Crops Prod.** J. 6:59–69. 1997.

SALLES FILHO, S.L.M. A dinâmica tecnológica da agricultura: perspectivas da Biotecnologia. Campinas: UNICAMP-IE, Tese de Doutorado. 1993.

SANTOS, B.T., BONALDO, S.M. e SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Essential oils of forest and medicinal species in the control ramulosis (*Colletotrichum gossypii* var.cephalosporioides) cotton. **Agroecology books**.Vol 6, 2236-7934. 2011.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência plantas medicinais. In: PASCHOLATI, S. F.(Coord.). **Primeira reunião brasileira sobre indução de resistência em plantas contra fitopatógenos: perspectivas para o século XXI**. São Pedro: ESALQ/USP, p. 27-28. 2002.

SEAGRI – Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Cultura – Algodão. 2012. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/Algodao.htm#Algodão> na Bahia. Acesso em 10/03/2016

SEELANAN, T., A. SCHNABEL, J.F. WENDEL Congruence and consensus in the cotton tribe (Malvaceae). **Syst. Bot.**, 22 pp. 259–290.1997.

SILVA, C.,M.S, FAY, E. F: Agrotóxicos & Ambiente. Brasília. **Embrapa Informação Tecnologia**, 2004.

SILVA, F.A.C., SANTOS, R.C., AZEVEDO NETO, A., GRANJA, M.M.C., SOUZA, C.C.F. e MELO FILHO, P. A. Descritores bioquímicos em cultivares de algodoeiro em resposta a inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. cephalosporioides. **Tropical Plant Pathology**, 35, p.114- 118. 2010.

SILVA, T. B. M., SIQUEIRA, H. A. A., OLIVEIRA, A. C., TORRES, J. B., OLIVEIRA, J. V., MONTARROYOS, P. A. V., FARIAS, M. J. D. C. Insecticide resistance in Brazilian populations of the cotton leafworm, *Alabama argillacea*. **Crop Prot., Guildford**, v. 30, n. 9, p. 1156-1161, 2011.

SIMON, J.E., MORALES, M.R., PHIPPEN, W.B., VIEIRA, R.F. e HAO, Z. Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In J Janick, ed, Perspectives on New Crops and New Uses. **ASHS Press**, Alexandria, VA, pp 499–505.1999.

SIMKIN, A. J., MIETTINEN, K., CLAUDEL, P., BURLAT, V., GUIRIMAND, G., COURDAVAULT, V., PAPON, N., MEYER, S., GODET, S., ST-PIERRE, B., GIGLIOLI-GUIVARC'H, N., FISCHER, M.J.C., MEMELINK, J., CLASTRE, M. Characterization of the plastidial *geraniol synthase* from *Madagascar periwinkle* which initiates the monoterpenoid branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma. **Phytochemistry**, 85, 36–43.2012.

SIMON, J.E., MORALES, M.R., PHIPPEN, W.B., VIEIRA, R.F. e HAO, Z. Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In J Janick, ed, Perspectives on New Crops and New Uses. **ASHS Press**, Alexandria, VA, pp 499–505.1999.

SINGH, B. B. et al. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A., TARAWALI, S. A., SINGH, B. B., KORMAW, P. M., TAMO, M. (ed.). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Ibadan, **IITA**. p. 22-40, 2002.

SINGH, M., KHOKHAR, S., MALIK, S. SINGH, R. Evaluation of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Extracts against American Bollyworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.3262-3268, 1997.

- SINGH R.P., DHANIA, G., SHARMA, A. and JAIWAL, P.K. Biotechnological approach to improve phytoremediation efficiency for environmental contaminants. In: Environmental bioremediation technologies. (Eds.: Singh S.N., R.D. Tripathi). **Springer**. pp. 223- 258.2007.
- SINGH, R.P., SINGH, H.B., SHARMA, A., RIZVI, S.M.H and JAIWAL, P.K. Phytoremediation of heavy metals using Indian mustard. **Brassica**, 3, 33-41 2002.
- SINGH-SANGWAN, N., SANGWAN, R.S., LUTHRA, R., THAKUR, R.S. Geraniol dehydrogenase: a determinant of essential oil quality in lemongrass. **Planta Med** 59: 168–170.1993.
- SOUZA , J.G. de , BELTRÃO , N.E. de M. , SANTOS ,J.W. dos . Influência da saturação hídrica do solo na fisiologia do algodão em casa de vegetação. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas** ,v.1,n.1 ,p.63-71 ,dezembro , 1997.
- SOUZA, D.C.L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.3, p.495-503. 2015.
- STEWART, J. MCD. Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering. In G. A. Constable and N. W. Forrester (eds.). Challenging the Future: Proceedings of the World Cotton Research Conference-f. CSIRO, Melbourne, Australia, pp. 313-327. 1995.
- SUASSUNA, N.D., COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: FREIRE, E.C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. 2.ed. Brasília: Abrapa, p.567-612. 2011.
- SUASSUNA, T. M. F., SANTOS, R. C., GONDIM, T. M. S. Cultivo do Amendoim: Importância econômica. Campina Grande: Embrapa Algodão, (Sistemas de Produção, 7). 2006.
- TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.449-484. 2004.
- TIAN, J., BAN, X., ZENG, H., HE, J., HUANG, B. e WANG, Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 2, p. 464-470, 2011.
- VIEIRA, R.F., GRAYER, R.J., PATON, A. e SIMON, J.E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochem Syst Ecol** 29: 287–304.2001.
- WANG, H. e DAVIS, R.M. Susceptibility of selected cotton cultivars to seedling disease pathogens and benefits of chemical seed treatments. **Plant Disease** 18:1085-1088. 1997.

WEBBER, C. L., BHARDWAJ, H. L. e BLEDSOE, V. K. Kenaf Production: Fiber, Feed and Seed. **Trends in new crops and new uses**. 327-339. 2002.

WEBBER, C.L. IIRUSSO, V.M., and MYERS, D.L.. Inhibition of weed and vegetable seed germination by allelopathy. **Proc. Int. Kenaf Assoc. Conf.** Oklahoma City, OK. Feb. 24–26, 2000, p. 35. 2000.

WENDEL, J.F., CRONN, R.C. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. **Adv Agron.** 78: 139–186. doi: 10.1016/s0065-2113(02)78004-8. 2003.

WENDEL, J. F., and ALBERT, V. A. Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium* L.): Character-state weighted parsimony analysis of chloroplast restriction site data and its systematic and biogeographic implications. **Syst. Bot.** 17: 115-143. 1992.

WENDEL, J. F., BRUBAKER, C. L. Y SEELANAN, T. The origin and evolution of *Gossypium*. En: Stewart, J.M., Oosterhuis, D., Heitholt, J.J. y Mauney, J.R. (Eds.). *Physiology of cotton*. Springer, Netherlands. 2010.

WENDEL JF, FLAGEL, L. e ADAMS KL. Jeans, genes, and genomes: cotton as a model for studying polyploidy. In: Soltis PS, Soltis DE, editors. *Polyploidy and Genome Evolution*. Berlin: **Springer**. pp. 181–207. 2012.

WURYATMO, E., KLIEBER, A. e SCOTT, E.S. Inhibition of Citrus postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, 51: 2637-2640. 2003.

YANG, T., LI, J., WANG, HAO-XIN e ZENGA, Y. A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. **Phytochemistry**, 66(3), 285–293. 2005.

CAPÍTULO II

Prospection of *geraniol synthase* in aromatic species to control of cotton ramulosis

Artigo submetido ao Journal of Applied Ecology (Qualis A1 em biotecnologia)

Prospection of *geraniol synthase* in aromatic species to control of cotton ramulosis

Journal	Journal of Applied Ecology
Full list of authors	Kaliny Veiga P. da Silva <i>RENORBIO UFRPE, 52.171-900, Dois Irmaos, Recife, Pernambuco, Brazil, kalinyveiga@hotmail.com</i> ; Yrlânia de L. Guerra, Agronomy, Agronomy Department Federal Rural University of Pernambuco, 52.171-900, Dois Irmaos, Recife, Pernambuco, Brazil, yrlalg@gmail.com; Gerckson Maciel R. Alves, <i>Estates University of Paraíba, Jackson.uepb@hotmail.com</i> ; Liziane M. de Lima, Agronomy, Embrapa Algodao, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenario, CEP:58428-095, Campina Grande, Paraíba, Brazil, liziane.lima@embrapa.br; Pericles A. Melo Filho, Agronomy, Agronomy Department Federal Rural University of Pernambuco, 52.171-900, Dois Irmaos, Recife, Pernambuco, Brazil, periclesmf@gmail.com; Roseane C. dos Santos, Agronomy, Embrapa Algodao, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenario, CEP:58428-095, Campina Grande, Paraíba, Brazil, roseane.santos@embrapa.br.
Corresponding author	kalinyveiga@hotmail.com
Word count	6.948
Number of figures	5
Number tables	3
Number of References	41

Prospection of *geraniol synthase* in aromatic species to control of cotton ramulosis

Kaliny Veiga P. da Silva¹, Yrlânia de L. Guerra², Gerckson Maciel R. Alves³, Liziane M. de Lima⁴, Pericles A. Melo Filho⁵, Roseane C. dos Santos⁶

¹Northeast Biotechnology Network RENORBIO UFRPE; ^{2,4} Agronomy Department Federal Rural University of Pernambuco, 52.171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil; ³Estates University of Paraíba; ^{4,6} Agronomy, Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenario, CEP:58428-095, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

Autor correspondente: kalinyveiga@hotmail.com

Abstract

1- - The cotton plant stands as a fibrous high value on the world market. The ramulosis is one of the diseases that damage the crop, caused by *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa can compromise the entire plant development.

2- The control of plant pathogens, made by pesticides, cause numerous environmental problems. Secondary metabolites are an agroecological alternative to the use of these pesticides, including geraniol, secondary metabolite class of monoterpenes that stands out for its fungicidal property.

3- This study aimed to prospect *geraniol synthase*, geraniol precursor enzyme, of aromatic species by molecular analysis by PCR and qPCR and route phytopathological tests in order to evaluate the expression of geraniol and efficacy of vegetable oils and their extracts in the prevention and control of ramulosis.

4- Eleven aromatic species were evaluated, including *Mentha pulegium*, *Ocimum basilicum*, *Origanum majorana* and *Rosmarinus officinalis*.

5- The *O. basilicum* oils and *M. pulegium* to 2000 ppm tested *in vivo* had effective results when compared to the commercial fungicide, and *M. Polegium* stood out with ISD around 30 % lower than that presented by commercial fungicide (40 %).

6- Results denote that the use of aromatic species can be an effective and sustainable alternative for the treatment of ramulosis. Furthermore, the genetic characterization of aromatic species is an important source of natural resource use information enabling new material holders genes of interest are found and serve as an alternative for environmental conservation strategies.

Key words: Fungi, essential oil, Fungicide, secondary metabolites, monoterpene.

List of abbreviation

Cgc- Colletotrichum gossypii South var. *cephalosporioides* Costa)

DNA -Deoxyribonucleic acid

RNA - Ribonucleic acid

NCBI - National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

RT- Reverse transcription

PCR - Polymerase Chain Reaction

RT-PCR- Reverse transcription polimerase chain reaction

qPCR - Real time quantitative Polymerase Chain Reaction

BOD - biochemical oxygen demand

PDA- potato dextrose agar

Introduction

Increased crop yields associated with cost reduction has been a major challenge for the agricultural competitiveness in any country on the world. The costs of chemical pesticides for plant defense against crop pests (pathogens, insects and weeds) has been the most responsible for the high cost of production, in addition to several negative effects that bring to man and the environment.

Brazil stands out as one of the largest producers of oil, grains and fiber, in addition to being is a major consumer of agrochemicals for crop protection (Pignati, *et al.* 2014). Only herbicides represented 45% of total marketed pesticides, fungicides and insecticides while participating with 14% and 12%, respectively (Anvisa 2013). Given of these costs, increasingly researchers have focused on alternative pest control in that contribute to minimize the costs and environmental damage. The use of plant products, the basis of extracts and essential oils, has demonstrated efficiency and viability of controlling a variety of pathogens and insects that attack crops (Singh *et al.* 2014; Guerra *et al.* 2015).

The literature provides several reports of plant species with wide biocide power, especially the owners of essential oils, because they have bactericidal activity, antiviral, antifungal and insecticidal (Iijima *et al.* 2004; Hussain *et al.* 2008; Lima *et al.* 2008). Essential oils are mainly terpenes and terpenoids (geraniol, sabinene, thymol, carvacrol, eugenol, etc.), which are shown as volatile molecules, low molecular weight and quite diverse structurally. These substances are known as aromatic and accumulate in all plant organs, developing functions such as germination inhibitors, action protection from predators, attraction of pollinators, among other (Isman, 2006).

The geraniol is a cyclic alcohol monoterpenoids, issued flowers of various kinds and also present in vegetative tissues of many herbs (Rao *et al.* 2000; Guerra *et al.* 2015). The products of oxidation, geranial and neral, citral form a compound of citrus odor and abundant species of the genera *Cymbopogon*, *Zingiber*, *Ocimum*, *Mentha*, *Origanum*, *Rosmarinus*, among other (Hussain *et al.* 2008; Karray-Bouraoui *et al.* 2009).

The role and effectiveness of geraniol in control of plant pathogens has been reported in several works by the repellent, fungicidal and bactericidal action (Rao *et al.* 2000; Guerra *et al.* 2015). The enzyme geraniol precursor is encoded by *geraniol synthase (GES)* which is open read frame ranging from 1.7 to 2.0 kb. The NCBI gene bank provides the sequences of *GES Cinnamomum tenuipilum* (Yang *et al.* 2005), *Olea europaea* (Vezzaro *et al.* 2012), *Catharanthus roseus* (Simkin *et al.* 2013), *Perilla setoyensis* (Masumoto *et al.* 2010), *Ocimum basilicum* (Iijima *et al.* 2004), *Phyla dulcis* (Yang *et al.* 2011) and *Vitis vinifera* (Martin *et al.* 2010). Alignment of these sequences reveals several homologous regions, which can be used as specific probes or tags which may be of assistance in studies of molecular phylogeny or relating to the protection of plants.

The cotton (*Gossypium* spp) is a very important crop in the world economy and one of the main crops in Brazil. Planted in several countries, provides fiber for textile production, animal feed and seeds for vegetable oil production. The Conab (2016) estimated that the area planted to cotton in the 2015/16 crop in the country amount to 956,7 thousand hectares. The cotton crop in the state of Mato Grosso, the main producer in the country in recent harvests, reached similar levels of productivity to the world's best. In the

agricultural year 2014/2015 have been grown in this state, 562,7 thousand ha with cotton, yielding fiber productivity of 1,638 ha⁻¹. This year, the fiber production in Mato Grosso accounted for 61.58% of the Brazilian production (Conab, 2016).

The costs of cotton production vary among the producing countries, the lowest are in Australia, China, Brazil and Pakistan. Already the US and Israel have the highest cost of world production (Icac, 2015). Much of this cost come from the large number of diseases that affect the crop, more than 250, 90% of them caused by fungi that occur in almost all producing regions causing economic damage. These quotes to ramulosis (*Colletotrichum gossypii* South var. *Cephalosporioides* Coast) that causes serious damage to crops, causing the plants to tip over, depending on the infestation level (Suassuna and Coutinho, 2011). When occurs before flowering, floral structures miscarry, affecting plant growth and the production of capsules (Melo *et al.* 2013). As control is carried by chemical pesticides, the possibility of control via essential oils can be an attractive and agroecological alternative for farmers who are financially dependent on the management of this crop.

Few studies have reported the use of plant metabolites to control *C. gossypii*, Lima *et al.* (2008) show that citronella oil (*Cymbopogon Nardus*) inhibited the mycelial growth, reducing mycelial growth in vitro to 2500 ppm, and reduction on the progression of the disease in the greenhouse. Essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Baccharis trimera* in concentration 1%, preventive treatment *in vivo* showed effect on cotton in the induction of resistance, reducing by 68.9% and 55.1% to ramulosis on treated plants, respectively (Santos *et al.* 2011).

Despite the large contribution of the findings available in the literature to control via plant extracts pathogens, there is limited information regarding *C. gossypii* and too the validation of oils *in vivo* assays that are essential to prove the pathogenicity and subsequent use of perspective the product agroecological system. In the present study we carried a phytopathological and molecular approach to dectar species possessing geraniol capable to inhibit the growth of *C. gossypii* in conditions *in vitro* and *in vivo*.

Material and methodos

Aromatic species and RNA extraction

Seeds of 11 aromatic species were achieved commercially and used for bioassays: *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, *Jasminum officinale* L., *Mentha pulegium* L., *Mentha viridis* L., *Ocimum basilicum* L., *Ocimum gratissimum* L., *Origanum majorana* L., *Peumus boldus* Molina, *Plectranthus amboinicus* (Lour.), *Rosmarinus officinalis* L. and *Ruta graveolens* L. The sown was carried out in greenhouse, in 2 L-pots containing previously fertilized soil (NPK, 10:10:10, ammonium sulfate, simple superphosphate and potassium chloride) and watered daily. After 30 days of emergence, 1g of young leaves of each accession were collected to RNA extraction, by using Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek), following the manufacturer's recommendations. The plants were kept in a greenhouse for later use in bioactivity assays.

RT-PCR semiquantitative and blotting analises

cDNA of each accession was synthesized using ImProm-IITM Reverse Transcription System kit (Promega). The reverse transcription was performed in

44 μL as follows: 11 μL of reaction, containing 1 μg total RNA, 0.5 μg Oligo dT₁₅ (10 mM), 1X ImProm-II Reaction Buffer, 6 μL MgCl₂ (25 mM), 0.5 μL dNTP set (10 mM), 1 U/ μL Recombinant Rnase Ribonuclease Inhibitor; 1.25 U/ μL ImProm-IITM RT. Samples were incubated in a thermal cycler, first at 25 °C for 5 min then at 42°C for 1 hour and 70°C for 15 min. All procedures followed the manufacturer's recommendations.

To semiquantitative assays, the reactions were performed in a 25 μL final volume containing 2 μL of cDNA (1 μg), 0.04 U *Taq* Polimerase (Fermentas), 0.2 mM dNTP set (10 mM), 1,5 μL MgCl₂ (25 mM), 1X kit buffer (10X) and 0.8 μL of each forward (5'- AGGTTGGAAGCGAGACGATTC- 3') and reverse (5'- GTTCCBAGATCATCCRRAG-3') *GES* primers (10 mM). The follow RT-PCR thermal condition was performed: pre-denaturation at 95°C/7 min, followed by 35 denaturation cycles at 94°C/1 min, annealing at 56 °C/1 min and extension at 72°C/1 min. A final extension was added at 94°C/5 min. As a constitutive control, a pair of forward (GATRTTGTTCATATCTGCACTTGCA) and reverse (GGCTCTTCTGATCATCCTCTTC) *β -actin* primers (10 mM) was used. Both *GES* and *β -actin* primers were designed to amplify a fragment of 0.52 kb.

The amplicons were analyzed in agarose gel (0.8%) and photo-documented (Bio-Imaging Systems – Mini Bis Pro, Uniscience). In order to validate the products generated by RT-PCR, a blotting was carried out, adapted by Butib *et al.* (2001). The amplicons were transferred to a nylon membrane (Hybond-N +, Amersham Pharmacia) by capillarity. A probe (0.52 kb) was generated with forward (5'- AGGTTGGAAGCGAGACGATTC- 3') and reverse (5'- GTTCCBAGATCATCCRRAG-3') *GES* primers (10 mM) and labeled with

AlkPhos Direct detected and Labeling and Detection Systems kit (Amersham) following the manufacturer's recommendation.

Relative expression of *GES* transcripts by Real Time

The relative expression of *GES* was estimated by qRT-PCR (Eco Real-Time PCR System - Illumina), according manufacturer's instructions. Reactions were performed in a 10 μ L final reaction containing 5 μ L of Evagreen (Biotium), 0.8 μ L of forward (5'- GGTGGTGGGAAGGATGCTCGGTTTGG-3') and reverse (5' – CCATARGTATCKAAAMTATCATC-3') *gs* primers (10 mM), and 2 μ L of cDNA (1:10, v/v). Two-step RT-PCR procedures were performed in all experiments. First, 95°C/15 min and 40 cycles of 95°C/20 sec, 60°C/20 s and 72°C/ 20 s. Then, a curve of denaturation (melting curve) was performed after the conclusion of the amplification at 95°C/15 s and 60°C/15 s, rising 2°C/min until reaching 95°C. The forward (TTGCAGACCGTATGAGCAAG) and reverse (ATCCTCCGATCCAGACACTG) *β -actin* primers (10 mM) were used as a constitutive control. Both *GES* and *β -actin* primers were designed to amplify a fragment of 172 bp.

The threshold cycle (Ct) and PCR efficiency was estimated by Real-time PCR Miner program (Zhao & Fernald, 2005). The analyses of gene expression were performed using the qBASEPlus program (Hellemans *et al.* 2007). The graphics, Cqs and Melt curves were automatically generated based on the normalization method with a reference gene, $\Delta\Delta Cq$ (Livak *et al.* 2001). The expression pattern was estimated by relative quantification.

The primers used in this study were previously designed from conserved regions of *GES* gene, obtained from alignment analysis performed in ClustalW2

program (www.ebi.ac.uk), with the following accessions available in NCBI bank: AJ457070.2 *Cinnamomum tenuipilum* (Yang *et al.* 2005), JN408072.1 *Olea europaea* (Vezzaro *et al.* 2012), FJ644545.1 *Perilla setoyensis* and FJ644547.1 *Perilla frutescens* var. *hirtella* (Masumoto *et al.* 2010), AY362553.1 *Ocimum basilicum* (Iijima *et al.* 2004) and GU136162.1 *Phyla dulcis* (Yang *et al.* 2011) and HM807399.1 *Vitis vinífera* (Martin *et al.* 2010).

Pathogenicity test in isolated *Cgc*

The tests were conducted with five isolates of the pathogen ramulose (*C. gossypii* var. *cephalosporioides*): CCMF-CNPA 0055, CCMF-CNPA 0058, CCMF-CNPA 0060, CCMF-CNPA 0061, CCMF-CNPA 0065 from different regions of Mato Grosso (Table 1).

For pathogenicity testing each isolate was cultured in potato dextrose agar (PDA) at 25° C with 12 hours photoperiod for 15 days to induce sporulation. Conidia suspensions were prepared by adding sterile distilled water (SDW) to the plates and the mycelium was scraped off gently. The resulting suspensions were filtered through a double layer of cheesecloth and the spore concentration adjusted to 1×10^6 conidia. ml⁻¹. In the greenhouse, the inoculation was performed by superficial wound sheet with the abrasive Celite followed by the inoculum suspension of spraying until the pour point in cultivar 8H with about 28 days old. Witnesses were composed of plants inoculated only with SDW. After inoculation, the plants were placed in a humid chamber for 72 hours. Each treatment consisted of six replicates, with two plants each, arranged in a completely randomized design.

The assessment of disease severity index (D.S.I.) was performed 50 days after inoculation using a rating scale described by Lima *et al* (2008): 1 - plants without symptoms; 2 - plants with necrosis and spots on young leaves; 3 - plants with necrotic spots on leaves and stems, death of apical meristems and internodes shortened; 4 - plants with necrosis and spots on leaves and stems, shortened internodes and overbudding and 5 - plants showing necrotic spots on leaves, shortened internodes, overbudding and reduction in size.

The average results of the disease ratings were calculated among the isolates by the formula $ID = \frac{\sum (\text{grade scale} \times \text{frequency})}{n^\circ \text{ total unit} \times \text{maximum degree of the scale}} \times 100$; using the degree of severity of the disease, estimated to descriptive of the scale scores from 1 to 5; After 78 days after emergence. The D.S.I. were subjected to analysis of variance and means were compared using the Scott-Knot test at 5%.

Bioactivity of essential oils and extracts from aromatic species against *Cgc*

An isolate of CCMF- CNPA058, obtained from cotton at Primavera do Leste, MT, Brazil (15° 31' 40" S, 54° 20' 45" W, 636 m) was used in bioassays. This isolate is highly pathogenic to cotton plants in previous assays carried out in greenhouse assays. CCMF- CNPA058 *Cgc* was maintained in BOD medium for further use in bioassays with the aromatic species.

Essential oils and crude extracts (10%) obtained from leaves were used in inhibition assays against *Cgc*. The leaves for obtaining extracts were collected in all standard hours, between 8 and 9:00 am. The extracts were analyzed: fresh , made with fresh leaves ; dry with dry leaves in a kiln (37 ° C /

48 h) ; heated, made with fresh leaves in infusion (infusion at 100 ° C / 10 min) . Both were adjusted to concentrations of 10 %, 5 % and 1%The pure essential oils were obtained commercially and used at 2000, 1500, 1000 and 500 ppm, based on methodology described by Lima et al (2008). Oils were added separately to PDA- culture medium (Gibco), at 50°C and poured onto Petri dishes (9 cm diameter). A disk cm - 0.5 PDA containing mycelium from CCMF-CNPA058-CGC selected previously was deposited in the center of each plate. Then, plates were randomized and incubated in BOD- growth chamber at 28°C and 12:12 h photoperiod. Thereafter, diameter of colonies was measured every 24 h during 7 days.

Field validation test

This trial was conducted at the end of the experiment using the most efficient extracts or oils that have been shown in previous bioassays. The bioactivity of the product was tested via spraying on plants of cotton plants grown in two environments through curatively or preventively. Seeds BRS 8H were grown in pots (15 L) containing sterilized soil fertilized, remaining two plants / pot. The isolated and adopted concentrations were the same already mentioned in previous trials. The planting was conducted in August / Recife 2015 (08° 03' 14" S, 34° 52' 52" W, 4m) and in September / 2015 Campina Grande (07° 13' 50" S, 35° 52' 52" W, 551m). During the test, the temperature averages, relative humidity and total rainfall recorded in both environments were 29.6 ° C, 59%, and 213.4 mm (Apac, 2015) respectively in Recife and 22.6 ° C, 57% and 154.0 mm in Campina Grande (Inmet, 2015).

The experiment consisted of curative treatments (CT) and preventive (TP). At 25 days after emergence, the plants of curative treatment (TC) were inoculated by spraying with a conidial suspension at a concentration of 1×10^6 . The plants were subjected to a moist chamber for 72 hours. When the first symptoms appeared, it was preceded spraying the product, the concentration established in previous bioassays. In TP, the plants were previously sprayed with vegetable product and after 24 hours, were inoculated with the same inoculum suspension and subjected to the humid chamber for 72h. As a positive control, plants were also sprayed with a commercial fungicide, at a dose of 1 ml/100 l of water. As control plants were inoculated with a conidial suspension at a concentration of 1×10^6 and received no treatment. The reviews of the incidence and severity of disease were performed with 50 days of inoculation, according to criteria described in Lima *et al* (2008): a) Initial Index disease (I.I.D), at 28 days after emergence, calculated by the formula $ID = \frac{\sum (\text{grade scale} \times \text{frequency})}{n^{\circ} \text{ total unit} \times \text{Maximum degree of the scale}} \times 100$, using the degrees of severity disease, estimated with the help of descriptive rating scale ranging from 1 to 5; b) disease severity index (D.S.I.), 55 days after emergence, calculated in the same manner that the I.I.D.

Statistical analysis

The bioassay was a randomized block in a factorial design with six repetitions each. Data were submitted to analysis of variance using Sisvar - UFLA v.5.3. Skott-Knott test were adopted ($p < 0.05$) to mean comparisons.

Results

Semiquantitative and relative expression of GES

Eleven aromatic species were used in prospective assays in order to evaluate the semiquantitative expression of *GES* transcripts. Ten species amplified a putative *GES*-band at 500 bp, further confirmed RT-PCR blotting (Fig. 1A-B). The relative expression of transcripts was estimated by qRT-PCR using β -*actin* as reference gene. We verified several expression levels of *GES* transcripts, especially to *M. pulegium*, *O. majorana*, *O. basilicum* and *R. officinalis*, with peaks of 100X, 25X, 20X and 17X, respectively (Fig. 2).

Pathogenicity test in isolated Cgc

The most aggressive isolates the pathogenicity tests showed disease index 62% (CCMF-CNPA055), 76% (CCMF- CNPA058), 58% (CCMF-CNPA060) and 49% (CCMF-CNPA065). The other isolates showed disease index below 50%, CCMF-CNPA061 being less pathogenic revealing disease rate of only 41%. Thus isolated CCMF- CNPJ 058 was selected to be used in phytotoxicity tests due to its high pathogenicity (Table 1).

Phytotoxicity of extracts and essential oil against Cgc

Based on the results obtained in expression assays, four species were selected for bioactivity against CCMF- CNPA058-Cgc, using leaf extracts and essential oils. Although it has been detected statistical difference between treatments, we verified that leaf extracts (fresh, heated or infusion) were limited to inhibit CCMF- CNPA058-Cgc growth at a safe margin (Fig. 3). No extract achieved at least 50% of inhibition of fungal growth. Hence, the possible

adoption of extracts of *M. pulegium*, *O. majorana*, *O. basilicum* and *R. officinalis* to control ramulosis is not viable, based on concentrations adopted in this study.

The bioassays carried out with essential oils showed satisfactory results to control ramulosis. Reduction in mycelial growth was perceived from 500 ppm and full inhibition at 1500 ppm (Figs 4 e 5), indicating that ramulosis control can be achieved at low concentration. The best result was verified with *M. pulegium* oil that reduced CCMF- CNPA058-Cgc growth in more than 80% at 1000 ppm, confirming results obtained in Figure 2.

Since this study used commercial oils, the obtained effects can not be attributed only to geraniol, must consider synergistic effect with other components of the worked oils.

Field validation tests

Based on previous results obtained *in vitro* cytotoxicity test, oils were chosen *M. pulegium*, *O. majorana* e *O. basilicum* a 2.000 ppm for validation of results in Recife – PE and Campina Grande – PB. Thus, the factor analysis scheme is 2x5 for preventive treatment: 2 (Recife-PE and Campina Grande - PB) x 5 (3 oils, one positive control and reference); 2x4 curative treatment: 2 (Recife-PE and Campina Grande -PB) x 4 (3 oils and witness) with six repetitions each.

In both places, the plants began to show the first signs of illness four days after the pathogen inoculation when the analysis was performed I.I.D., the first symptoms appeared as necrotic spots on the leaves, especially in young leaves. Table 2 shows epidemiological components I.I.D and D.S.I. obtained from the preventive treatment table reflects what was observed during the field

experiment, the *M. pulegium* oil and fungicidal initially had the same effect on the delay of disease no statistical difference in the I.I.D, as the *O. basilicum* oil influenced the early development, but on a smaller scale that *M. pulegium*, *O. majorana* oil had no effect on the pathogen with the disease and developing just like the control. Over the days the symptoms have evolved with the appearance of more necrotic spots shortening of internodes, death of the apical bud and overbudding. The D.S.I. in the preventive treatment showed that the oil from *M. pulegium* comes to have superior fungicidal effect to a statistically difference in Campina grande-PB experiment and equaling in Recife -PE, other oils also showed effect on D.S.I. but with income below the commercial fungicide. Curative treatment with eyes also showed satisfactory results regarding the effect exerted on the development of ramulosis. In Table 3 shows the epidemiological components I.I.D and D.S.I. for this treatment. The plants treated with the oils showed a delay in disease symptoms while in control I.I.D was higher and statistically different from the other treatments (Table 3). In the fifty days after inoculation in both locations, the *O. basilicum* oils and *M. pulegium* delayed the disease D.S.I. ranging 31-36% with no statistical difference between treatments, while the control showed I.I.F 71% with plants severely compromised by disease.

Discussion

Cultivated plants are commonly attacked by various types of pests and diseases as a result of these attacks have serious damage to culture and even loss of productivity. Chemical pesticides are widely used in attempts to control these attacks, however searches advance in the search for substitutes less

aggressive to the environment and to humans. In this quest out in front substitutes with insecticidal properties and/or fungicide that are easy to handle and low cost especially for farmers with less purchasing power. In this context the extracts and vegetable oils which can be easily manipulated and produced by the growers themselves (Mazzonetto & Vendramim, 2003; Celoto *et al.* 2011).

Identify new species with potential for production of these oils and extracts is of utmost importance for the development of a sustainable and free agriculture agrochemicals. The use of molecular tools consisted of this work, an effective alternative to identify these species. Advances in biotechnology through the use of molecular markers and or specific primers is allowing the genotypic differentiation between species, as well as facilitating the characterization of gene resources in different species skillfully (Souza, 2015).

The pair of specific primers previously designed to *GES* (0.52 kb), forward (5'- AGGTTGGAAGCGAGACGATTC- 3') and reverse (5'- GTTCCBAGATCATCCCRRAG-3'), It was efficient to detect gene in the species analyzed via semiquantitative expression (RT-PCR). The development of specific primers and probe is of fundamental importance for the detection of the gene under study, since they amplify and hybridize, respectively, complementary sequences present in the template DNA molecules (Souza, 2015), so that only species that showed no amplicon was *M. viridis*, that although owns strong odor characteristic of the presence of geraniol in some herbs, does not present geraniol in the composition of its essential oil, whose main constituents linalool, carvone and α -terpinene (Ashnagar *et al.* 2007; Mkaddem *et al.* 2009).

Real time tests (qRT-PCR) conducted using the β -actin gene as a reference revealed wide variation in the expression of *GES* transcripts. Due to its high specificity and sensitivity of the technique allowed the detection cycle after the target DNA sequence of the amplification cycle (*GES*) and the reference gene (β -actin) enabling a comparative analysis of the expression of this gene between samples (Fujimoto, *et al.* 2010). The four species holders of the highest summits *M. pulegium*, *O. majorana*, *O. basilicum* and *R. officinalis*, according to research presented geraniol concentrations and its derivatives in its constitution (Vera & Chane-Ming 1999; Pintore *et al.* 2002; Hussain *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2012).

The essential oil composition of *M. pulegium* with the highest peak expression of geraniol (100x) is primarily made of oxygenated monoterpenes, including geraniol (Karray-Bouraoui *et al.* 2009; Teixeira *et al.* 2012), and the main oil components are menthone and pulegone, compounds known as antioxidant and bactericidal activities (Roberto & Baratta, 2000) and although according to the results of this study, this oil presents effective fungicidal activity against *Cgc*, there is no reports in the literature fungi control the same. This result indicates that this species may be a potential candidate for use in sustainable management and the molecular tool is indeed effective for prior selection of species for these purposes.

Previously selected for molecular assays, the species *M. pulegium*, *O. majorana*, *O. basilicum* and *R. officinalis* were submitted to the phytotoxicity tests under laboratory conditions and in general, the treatments with fresh extract, heated dry extract and infusion not They were satisfactory for full control of growth *Cgc* (Fig. 3), however, it was found that some species have

potentiated the treatments infused and heated dry extract. In both treatments *O. basilicum* 10%, field control in about 50% of growth *Cgc* (Figure 3). According to some authors, we can attribute this increase in *O. basilicum* efficiency heat employment in metabolite extraction, since in some cases, depending on the species worked, some metabolites are Librados more easily in heat presence (Silva, 2006). Among the species analyzed via extracts, *O. basilicum*, forms of heated dry extract or infusion is the species most suitable for control of *Cgc* in concentrations above 10%. Despite not having been found contributory results to control ramulosis from extract of selected aromatic species in the literature are several reports on the contribution of extracts for protection of plants, However, it is worth noting that choosing a metabolite must not only be done considering their effectiveness control, but also the availability and handling of this material. In these terms, extracts the high percentages are not feasible for application in the field, as they require large amount of available plant material, as well as more space for cultivation and logistical difficulties for the preparation of extracts.

The activity of oils, however, was more effective in pathogen control by submitting a hydrophobic constitution, oils span the cell wall and the plasma membrane by changing the polysaccharide structure, fatty acids and phospholipids resulting in cell lysis, it gives oil higher pathogen control capacity than the extracts (Tolouee *et al.* 2010; Shao *et al.* 2013). The *M. pulegium* oil was brighter by reducing the inhibition of the fungus in more than 80% to 1000 ppm (Fig. 4 and 5). Since this is an impressive result que opens up possibilities of control of this pathogen with lower cost cotton crops. The oil of this species is primarily made up of oxygenated monoterpenes, including geraniol (Karray-

Bouraoui *et al.* 2009; Teixeira *et al.* 2012), however, there is the activity reports literature fungicide for this oil, which is best known for its bactericidal action.

In vivo assays were performed in different environments in order to demonstrate the effectiveness of the oils used, both places provided favorable environmental conditions for disease development and validation of results. According to Carvalho (1971) analysis of several isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* cotton collected in regions of Goiás in Brazil, has shown that the best temperature for fungus growth is 28° C and below 15° C and above 33° C, growth is markedly reduced. According to the results obtained even under environmental conditions conducive to the development of ramulosis, oils had a positive effect on pathogen control and no phytotoxic effect on the plants was observed at the concentration used. The *M. pulegium* oil showed statistically superior results to the commercial fungicide can be safely recommended for control of ramulosis cotton, mainly agroecologic systems, have low toxicity to men and animals and non-persistent in the environment. The information on the application of essential oils against *Cgc* cotton are limited. In a recent study conducted by Melo *et al.* (2013), the authors report the use of *Syzygium aromaticum* L. oil to 1000 ppm in control *Cgc* under field conditions, where thirty days after the inoculation *Cgc* isolated on young plants cotton D.S.I. was controlled at about 67%. Lima *et al.* (2008) show that the oil of *Cymbopogon nardus* L. 2000 ppm *in vivo* assays *Cgc* have limited effect on the concentration used which was observed D.S.I. 98% at the end of the analysis. These results attest to *M. pulegium* oil efficiency and even *O. basilicum* oil to a lesser extent also had effect on the progress of ramulosis in cotton in preventive and curative treatments (Tables 2 and 3).

Given the difficulties of management and spending on chemical pesticides in cotton, as regards the control of ramulosis *C. gossypii* var. cephalosporioides, the use of vegetable oils *M. pulegium* and *O. basilicum*, *in vivo*, it is confirmed as a low cost alternative and similar efficacy to commercial fungicides to control *Cgc*, with the advantage of not bringing risks to the farmer and environment constituting a safe and sustainable way to control the pathogen in the fields. Additionally, the genetic characterization of species of medicinal and aromatic plants is an important activity to expand the use of natural resources, it enables new materials holders of genes of interest are found and serve as a basis for environmental conservation strategies.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest between the partners with the release d the results.

References

- Anvisa. Pesticide Residue Analysis Program in Food (FOR). (2013). [Accessed July 2015]. Available in:<http://www.anvisa.gov.br>.
- Apac [Accessed June 2016]. Available in:http://www.apac.pe.gov.br/arquivos_portal/informes/Informe_Climatico_Setembro_2015.pdf
- Ashnagar, A., Gharib Naseri, N., Foroozanfar, S., 2007. Isolation and identification of the major chemical components found in the upper parts of *Teucrium polium* plants grown Khuzestan Province of Iran. *Chin. J. Chem.* **25**, 1171–1173.
- Butib, A.M., Jardía, R., Boschc, A., Rodrígueza, F.G., Sánchezc, R., Pintoc, X., Costaa, J.F., Sánchez-Ávilab, M., Cotrinaa, R., Estebanb, y. & Guardia, J. (2001). Valoración de la técnica de PCR-Southern blot para el análisis de la viremia en pacientes con hepatitis aguda *Gastroenterol Hepatol.*, **24**: 1-4.
- Carvalho, L.P., Carvalho, J.M.F.C., Lima, E.F. & Cavalcante, F.B. (1971). Influence of the concentration of spores and pathogenicity of *Colletotrichum gossypii* South. Var. cephalosporioides A. S. Costa and evaluation of resistance cultivars and lines cotton herbaceous to ramulosis. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. **6**, n. 3, p. 395-402,.
- Celoto, M.I.B., Papa, M.F.S., Sacramento, L.V.S. & Celoto, F.J. (2011). Antifungal activity of *Momordica charantia* L. extracts on *Colletotrichum musae*. *Journal of Medicinal Plants*, Botucatu, **13**, n. 3, p. **337-341**.
- Conab agricultural monitoring - winter crops (crop 2015) and summer (season 2015/16). [Accessed January 2016] Available at: <http://www.conab.gov.br/>
- Fujimoto, T., Konagaya, M., Enomoto, M., Tsuboi, K., Hashimoto, K. & Taniguchi, K. (2010). Novel high-speed real-time PCR method (Hyper-PCR): results from its application to adenovirus diagnosis. *Jpn J Infect Dis.* **63**:31-5.
- Guerra, Y.L., Oliveira, T.A.S., Laranjeira, D., Lima, L.M., Melo-Filho, P.A. & Santos, R. C. (2015). Control of *Sclerotium rolfsii* in peanut by using *Cymbopogon martinii* essential oil. *Afr. J. Microbiol. Res.* **Vol. 9(27)**, pp. 1684-1691.
- Hellems, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesomepele, J. (2007). Base relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**: R19.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H. & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum*

basilicum) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry*, **108**, n. 3, p. 986-995.

Icac – Cotton This Month [Accessed January 2015]. <https://www.icac.org/> 2015.

Iijima, Y., Gang, D.R, Fridman, E., Lewinsohn, E. & Pichersky, E. (2004). Characterization of *Geraniol Synthase* from the Peltate Glands of Sweet Basil. *Plant Physiol.* **134**.

INMET [Accessed june 2015]. <http://www.inmet.gov.br>

Isman, M.B. (2006). The role of botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* **51**, p.51-66.

KarraY-Bouraoul, M., Rabhi, M., Neffatl, M., Baldan, B., Ranieri, A., Marzouk, B., Lacha, M. & Smaoui, A. (2009). Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Ind Crop Prod* **30:338**,Đ343.

Lima, W.G., Santos, R.C., Câmara, C.A.G., Câmara, M.P.S & Melo Filho P.A. (2008). Citronella oil inhibits cotton ramulosis in controlled conditions. *Pest Tech.*, **2(1)**: 24-27.

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, **25(4)**, 402-408.

Martin, D.M., Aubourg, S., Schouwey, M.B., Daviet, L., Schalk, M., Toub, O., Lund, S. T. & Bohlmann, J. (2010). Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *Plant Biol.* **10**, 226.

Masumoto, N., Korin, M. & Ito, M. (2010). Geraniol and linalool synthases from wild species of perilla. *Phytochemistry*, **71** (10).

Mazzonetto, F. & Vendramim, J.D. (2003). Post Effect of Plant Origin on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) in stored beans. *Neotropical Entomology*, **v.32**, n.1, p.145-149.

Melo, R.M.C.A., Melo- Filho, P.A., Câmara, M.P.S., Lima W.G. & Santos, R.C. (2013). Preventive control of cotton ramulosis using clove oil at low concentration. *International Journal of Agricultural Science Research*, **2(3)**, pp. 060-066.

Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F. & Romdhane, M. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant

Activities of *Mentha (longifolia L. and viridis)* Essential Oils. *Journal of Food Science*, **74**, M358-M363.

- Pignati, W., Oliveira, N.P. & A.M.C. Silva. (2014). Surveillance on pesticides: quantification of use and prediction of impact on health, work and the environment for Brazilian municipalities. *Ciência & Saúde Coletiva*, **19(12)**:4669-4678.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R. & Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oil from Sardinia and Corsica. *Flav. Fragr. J.* **17**, 15-19.
- Rao, B.R.R., Sastry, K.P., Saleem, S.M., Rao, E.V.S.P., Syamasundar, K.V. & Ramesh, S. (2000). Volatile flower oils of three genotypes of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.). *Flavour Fragr J*, **15**: 105–107.
- Roberto, G. & Baratta, M.T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem* **69**: 167-174
- Santos, B.T., Bonaldo, S.M. & Schwan-estrada, K.R.F. (2011). Essential oils of forest and medicinal species in the control ramulosis (*Colletotrichum gossypii* var.cephalosporioides) cotton. *Agroecology books*.Vol **6**, 2236-7934.
- Shao, X., Cheng, S., Wang, H., Yu, D. & Mungai, C. (2013). The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. *J. Appl. Microb.* **114(6)**:1642-1649.
- Silva, G.S. (2006). Natural substances: an alternative for the control of diseases. *Brazilian Phytopathology*. Brasília, **31**, p. 9.
- Simkin, A.J., Miettinen, K., ClaudeL, P., Burlat, V., Guirimand, G., Courdavault, V., Papon, N., Meyer, S., Godet, S., ST-Pierre, B., Giglioli-Guivarc'H, N., Fischer, M.J.C., Memelink, J., Clastre, M. (2013). Characterization of the plastidial *geraniol synthase* from *Madagascar periwinkle* which initiates the monoterpenoid branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma. *Phytochemistry*, **85**, 36–43.
- Singh, N., Wang, C. & Cooper, R. (2014). Potential of Essential Oil-Based Pesticides and Detergents for Bed Bug Control. *journal of economic entomology*. **107**.
- Souza, D.C.L. (2015). Molecular techniques for characterization and conservation of medicinal and aromatic plants: a review. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, **v.17, n.3**, p.495-503.
- Suassuna, N.D. & Coutinho, W.M. (2011). Management of major diseases of cotton in the Brazilian cerrado. In: Freire, E. C. (2 Ed.). *Algodão no Cerrado do Brasil*, Brasília, p.567-612.

- Teixeira, B., Marquesa, A., Ramosa, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A. & Nunes, M.L., (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind. Crop. Prod.* **36**, 81–87.
- Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S.J., Jaimand, K., Taeb, J., Rezaee, M.B., Kawachi, M., Ghahfarokhi, M.S. & Abyaneh, M.R. (2010). Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus nigervan* Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*, **139**, pp. 127-133.
- Vera, R.R. & Chane-ming, J. (1999). Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. *Food Chem.*, **66**, 2, 143-145.
- Vezzaro, A., Krause, S.T., Nonis, A., Ramina, A., Degenhardt, J. & Ruperti, B. (2012). Isolation and characterization of terpene synthases potentially involved in flavor development of ripening olive (*Olea europaea*) fruits. *J. Plant Physiol.* **169** (9), 908-914.
- Yang, T., Li, J., Wang, Hao-xin & Zenga, Y. (2005). A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochemistry*, **66**(3), 285–293.
- Yang, T., Stoopen, G., Yalpan, I.N., Vervoor, T.J., DE Vos, R., Voster, A., Verstappen, F.W., Bouwmeester, H.J. & Jongsma, M.A. (2011). Metabolic engineering of geranic acid in maize to achieve fungal resistance is compromised by novel glycosylation patterns. *Metab. Eng.* **13** (4).
- Zhao, S. & Fernald, R.D. (2005). "Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction." *J Comput Biol* **12**(8): 1047-64.

Table 1. Pathogenicity test in isolated *Cgc*: Disease severity indexes in different isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* in plants *Gossypium hirsutum* cultivars 8H

Isolado	Local	Localização	ISD (%)
CCMF-CNPA055	Pedra Preta/MT	16°37'23"S; 54°28'26"W, 248m	65.20d
CCMF-CNPA058	Primavera do Leste/MT	15°33'32S; 54°17'46"W, 660m	76.00e
CCMF-CNPA060	Campo Verde/MT	15°32'48"S; 55°10'08"W, 736m	58.40c
CCMF-CNPA061	Primavera do Leste/MT	15°33'32"S; 54°17'46"W; 660m	40.20a
CCMF-CNPA065	Novo São Joaquim/MT	14°54'21"S; 53°01'06"W, 400 m	49.80b
C.V.(%)			3.48

Means followed by the same letter do not differ by the Scott-Knot cluster test ($p = 0.05$).

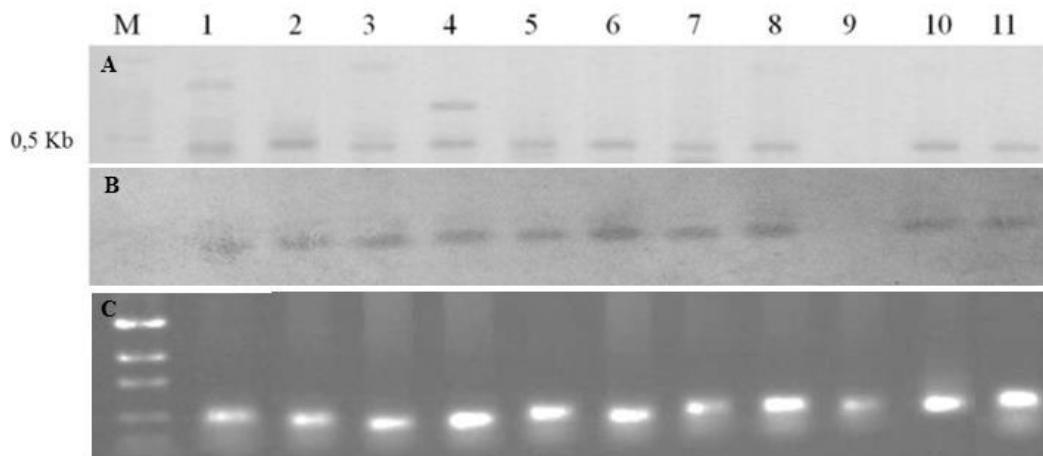


Figure 1. A- amplicons generated by semiquantitative RT-PCR by using primers *ges*. B- Blottings of *ges* generated by probe (0.50 kb) labeled with alkaline phosphatase. C- amplicons generated by β -actin primers (0.52 kb), used as reference control. M- Marker Ladder 100 bp (Ludwig); 1- *R. officinalis*; 2- *O. gratissimum*; 3- *R. graveolens*; 4- *P. boldus*; 5- *C. nardus*; 6- *P. amboinicus*; 7- *J. officinale*; 8- *O. majorana*; 9- *M. viridis*; 10- *M. pulegium*; 11- *O. basilicum*.

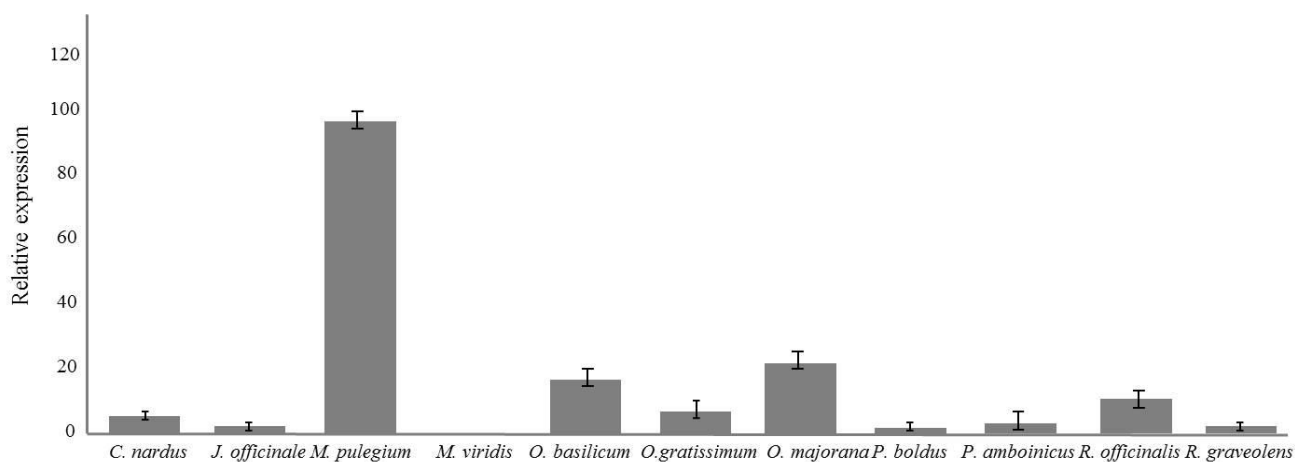


Figure 2. Relative expression of *GES*. Chart generated by the Eco Real-Time PCR System program (Illumina) from data Δ Cq and Melt curve, based on the regulation of β -actin.

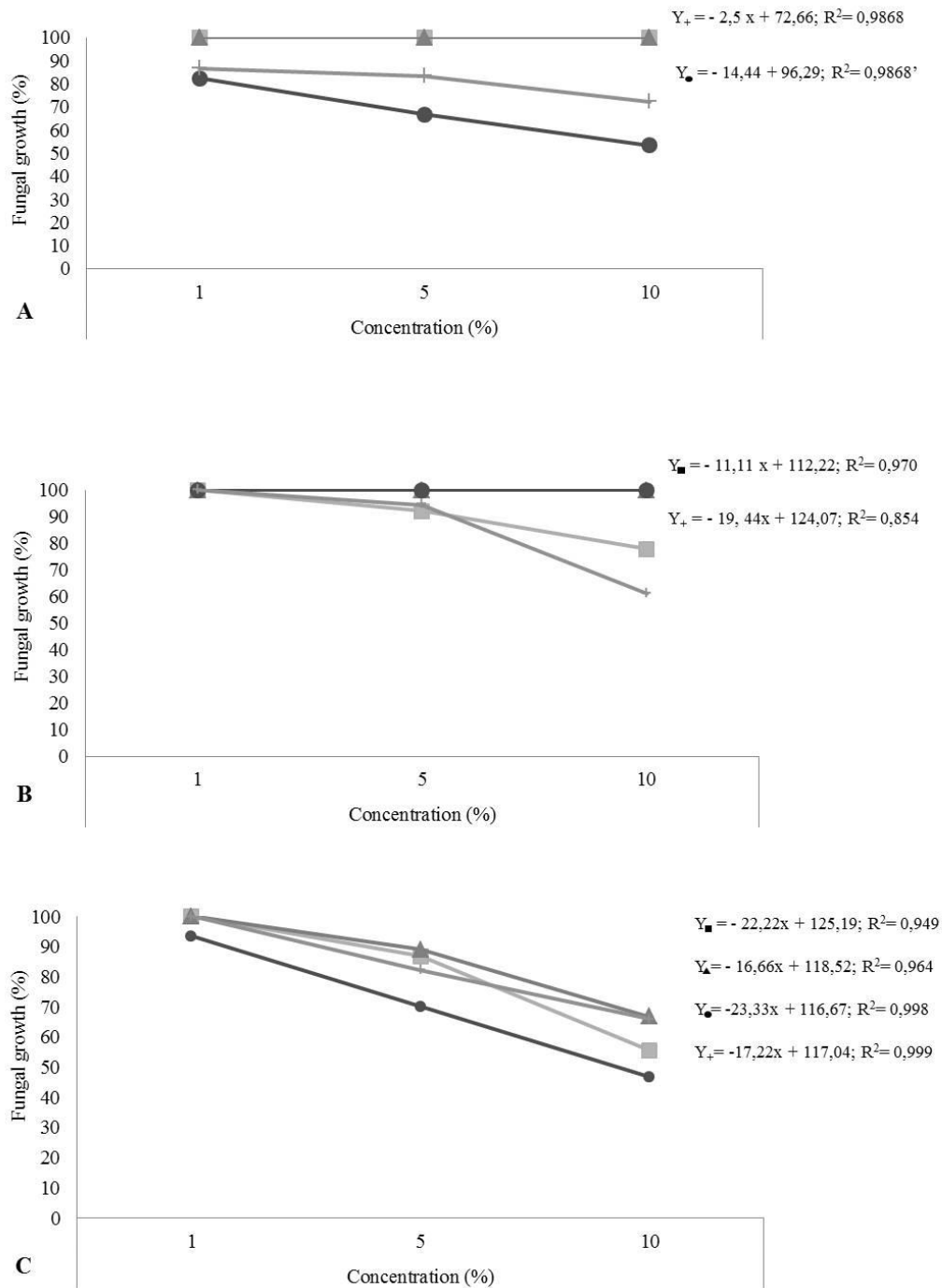


Figure 3. Growth inhibition *C. gossypii* in PDA containing infusion of fresh leaves (A), fresh extracts (B) and heated dry extract (C) four plant species: ●- *Ocimum basilicum* L.; + - *Mentha pulegium*; ■ -*Rosmarinus officinalis* e D: ▲- *Origanum majorana*. Regression equation and R^2 are shown for each sample obtained by the Scott-Knott test 0.05. Coefficients of variation (CV) and F values for the following treatments: A- 1.40 e 117.77; B- 0.88 e 857.70; C- 1.52 e 181.36.

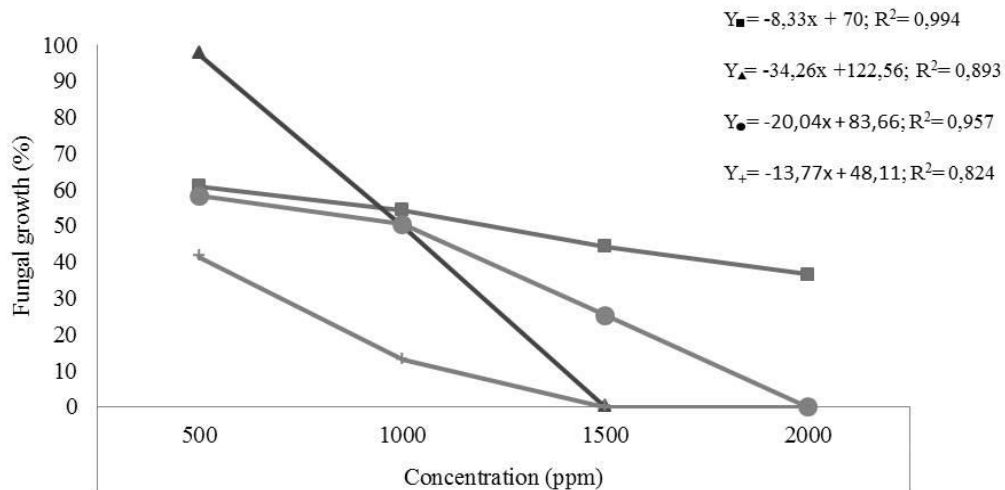


Figure 4. *C. gossypii* of mycelial growth inhibition grown in PDA containing essential oil of 4 species. ●- *Ocimum basilicum* L.; + - *Mentha pulegium*; ■ -*Rosmarinus officinalis* e D: ▲- *Origanum majorana*. Regression equation and R² are shown for each sample obtained by the Scott-Knott test 0.05. Coefficient of variation: 4.47, F:361.40.

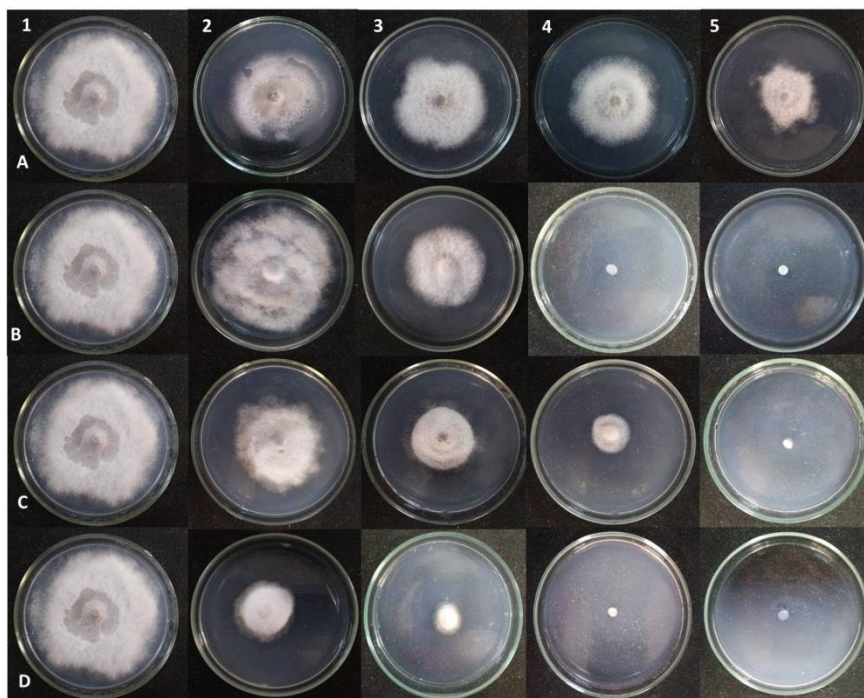


Figure 5: *C. gossypii* Inhibition of mycelial growth in PDA medium with different concentrations of essential oils. Treatments: A- *Rosmarinus officinalis*; B- *Origanum majorana*; C- *Ocimum basilicum*; D- *Mentha pulegium*. Concentrações: 1- Control; 2- 500ppm; 3- 1000ppm; 4- 1500ppm; 5- 2000ppm.

Table 2. Preventive treatment: Initial Index disease (I.I.D.) and final disease severity index (D.S.I.) in *Gossypium hirsutum* previously treated with vegetable oil and subjected to two local Ramulosis

Treatment	Campina Grande - PB		Recife - PE	
	I.I.D.(%)	D.S.I. (%)	I.I.D. (%)	D.S.I. (%)
1	19.32b	51.66b	17.59b	53.33b
2	14.14a	38.33a	14.14a	33.33 ^a
3	24.49c	63.33c	19.31b	60.00b
4	24.49c	76.67d	26.87c	71.67c
5	14.14a	46.67b	14.14a	41.67 ^a
CV(%)	15.88	6.19	15.88	6.19

SUBTITLE: 1- *O. basilicum*; 2- *M. pulegium*; 3- *O. majorana*; 4- Control (fungus + water); 5 - fungicide treatment; I.I.D- inical Index disease evaluated four days after inoculation; D.S.I.- Index of the final severity of the disease evaluated 50 days after inoculation; C.V. - coefficient of variation. Comparison of means within the columns and averages with the same letters do not differ statistically by Scott Knott test ($p < 0.05$). The original data processed by $\sqrt{x + 0.5}$ for statistical analysis.

Table 3. Curative treatment: Initial disease index (I.I.D.) and final severity index of disease (D.S.I.) in *gossypium hirsutum* subjected to Ramulosis and curatively treated with vegetable oils in two locations

Treatment	Campina Grande - PB		Recife – PE	
	I.I.D.(%)	D.S.I. (%)	I.I.D. (%)	D.S.I. (%)
1	21.04b	36.67a	14.14a	35.00a
2	14.14a	31.66a	14.14a	31.66a
3	14.14a	46.67b	22.77b	55.00b
4	26.87c	76.67c	26.87c	71.67c
CV(%)	16.29	5.51	16.29	5.51

Subtitle: 1- *O. basilicum*; 2- *M. pulegium*; 3- *O. majorana*; 4- Control (fungus + water); I.I.D.- initial Index of disease assessed four days after the application of oils; D.S.I.- Index of the final severity of the disease evaluated 50 days after inoculation; C.V. - coefficient of variation. Comparison of means within the columns and averages with the same letters do not differ statistically by Scott Knott test ($p < 0.05$). The original data processed by $\sqrt{x + 0.5}$ for statistical analysis.

CAPÍTULO III

Effect of kenaf oil on mycelial growth and spores production the *colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides* agent causal of ramulosis in cotton

Artigo submetido ao jornal Agronomy for Sustainable Development, B1- biotecnologia

Effect of kenaf oil on mycelial growth and spores production the *colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides* agent causal of ramulosis in cotton

K.V.P. Silva^{1*}; Y.L., Guerra² and P. A., Melo Filho³

¹RENORBIO, Federal Rural University of Pernambuco, 52.171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil; ²Agronomy Department Federal Rural University of Pernambuco, 52.171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil; ³Agronomy Department Federal Rural University of Pernambuco, 52.171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil.

Corresponding author: kalinyveiga@hotmail.com

Abstract

The cotton crop is affected by numerous pathogenicity, including the ramulosis, caused by the fungus *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* and known to cause serious economic damage to culture. Essential oils of plants they are constituted for volatile elements that exercise a fundamental role in the defense against microorganisms. Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) belongs to the family Malvaceae and is rich in compounds known as polyphenols, alkaloids, tannin and essential oils. The aim of this study was to evaluate the effect of kenaf oil on the development of the fungus *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, responsible agent for ramulosis in cotton. For this, phytopathological tests were performed on isolated Cgc 287, of *C. gossypii*, that avaluating fungic growth and production the spores under the effect of Kenaf oil at concentrations of 25, 50 and 75 uL/ml beyond the fungicidal effect the oil on the same isolate. It was found by regression analysis that there was no reduction in mycelial growth of *C. gossypii* in the Kenaf oil concentrations adopted in this work. Data submitted by the fungal growth, fungistatic effect and production spore revealed no statistical difference between the treatment with oil and control. Based on kenaf oil composition, rich in ingredients fungicide, even this oil showing no control over the *C. gossypii* in present study, it is believed that in higher concentrations that adotadas, it can have an effect on this pathogen.

Keywords: Fungi control; Secondary metabolites; Plant diseases; Cotton

1- Introduction

The cotton, belonging to Malvaceae family and the genus *Gossypium* and it is represented by the cultivated species *Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. and *G. herbaceum* L (Craven et. al., 1994). Such species are grown worldwide and have great importance for the economy of several countries, supplying fiber for textile industry, animal food and raw material for the production of vegetable oil from its seeds. *G. hirsutum* L. It is the most cultivated species, accounting for over 90% of world production (Alves et al., 2009). Is estimated that about 350 million people are connected to the production of cotton from farms to logistics, ginning, processing and packaging (Abrapa, 2015).

The cotton crop is affected by numerous pathogenicity, including the ramulosis, caused by the fungus *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* and known to cause serious economics damage to culture (Kimati et al., 2005). In Brazil, this disease is spread by all regions of the country where the cotton is grown causing damage in the states of Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, in some regions of the Northeast and Paraná, also being reported in Venezuela and Paraguay (Cia and Salgado, 2005). Symptoms develop initially on young leaves with the appearance of necrotic spots annular, the necrotic tissue subsequently breaks up, causing holes in the leaves that lead to uneven growth of tissue and wrinkling of the leaf blade. It also occurs death of the meristem that stimulates the formation of branches and short internodes characterizing the overbudding (Suassuna and Coutinho, 2011). When it occurs before flowering floral structures abort affecting plant growth and the production of capsules (Silva et al. 2010; Melo et al. 2013). The losses resulting from

infestation can reach 80%, depending on the susceptibility of the cultivar, there are losses mainly productivity and quality of the fibers and seeds (Freire et al., 1997).

Many plants are not susceptible to injuries caused by pathogens and pests and developed response mechanisms to attack these organisms (Pinheiro et al., 1999; Lara, 1991). These mechanisms can be of different types classified as chemical, physical or related to leaf structure (Melo; Silva-Filho, 2002; Harbone, 1988). Chemical protection of plants includes the synthesis of secondary metabolites, these increase the probability of survival of a species, they are essential for adaptation in different ecosystems. Metabolites are responsible for different biological activities and may act as antifungal, antibacterial and antiviral, as well as protecting plants against insect attack or herbivores, also featuring action in the germination inhibition or toxic activities to other plants or act attracting some insects to favor the dispersal of pollen and seeds (Aerts et al., 1991; Fumagali, et al 2008; Marei et al. 2012).

The essential oils of plants are volatile elements that exercise key role in the defense against microorganisms, are basically composed of terpenes, class of metabolites synthesized by the mevalonate route (Simon, 1999). These oils are usually prepared by aleatory glandular cells or bristle glandular found in the leaves (Bonner, 1961), it is stored in extracellular spaces between the cuticle and the cell wall (Taiz and Zeiger, 2004).

Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) it belongs to the Malvaceae family and is native to regions of India and Africa and is a valuable source of fiber (Mohamed et al., 1995). This plant is known to be rich in compounds like polyphenols,

alkaloids, tannins and essential oils (Agbor et al. ,2005; Kobaisy et al . , 2001). According to Kobaisy et al (2001), the essential oil of kenaf exerts inhibitory activity on growth *in vitro* de *Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. accutatum* at concentrations from 0,1 mg/ml, this oil may be tested for pathogens and other species serving as alternate control of these microorganisms.

The objective of this study was to evaluate the effect of kenaf oil on the development of the fungus *C. gossypii* var. *cephallosporioides*, responsible agent for the ramulosis in cotton.

2- Materials and methods

The oil of kenaf (*H. cannabinus*) leaves, was obtained by extraction performed with the Clevenger apparatus, the Chemistry Laboratory of the Federal Rural University of Pernambuco, according to the methodology described by Rassoli and Mirmostafa (2003). The isolate used in the analysis was the *C. gossypii* var. *cephallosporioides* Cgc 287, from the municipality of Montvidéu – GO.

- Kenaf oil effect on the mycelial growth of *C. gossypii*

To evaluate the inhibition of mycelial growth, essential oils were added in the culture medium fondant BDA (45 – 50 °C) which was poured into Petri dishes. The concentrations used were 25, 50 and 75 µl of oil /1ml with seven repetitions each and completely randomized design. In the center of each plate was deposited an 0.8 cm diameter disk through PDA containing mycelium from *C. gossypii* with seven-day old. The plates were incubated in B.O.D. (Biological

oxygen demand) at a temperature of 25 ° C and 12 hour photoperiod. From the incubation, the mean diameter of colonies per 24 hours was measured by measuring in two opposite senses diametrically, up to the witness reach the plate edges. The percentage inhibition of mycelial growth was estimated according to the methodology described in Edginton et. al. (1971).

- Kenaf oil fungicidal effect on *C. gossypii*

The treatments of fungal growth was observed under an optical microscope using preparations stained with blue in Amman glass slides. Subsequently, the treatments showed reduced growth or lack of growth compared to controls, were picked in the center of Petri plates containing only PDA. Then the plates were incubated at room temperature for seven days. Evaluations were made every two days over the average of two diametrically opposed measures in centimeters, with the help of a scale.

- Kenaf oil effect the production of spores of *C. gossypii*

Five replicates of treatments that showed development of the colonies in the assays of mycelial growth, was used for spore count. In each plate were added 20 ml of distilled water and with the aid of glass sheets carried to the surface scraping of the colonies and then filtering the suspension with the aid of tissues.

The analisis for counting spores were made on the tenth day of growth in optical microscope with a Neubauer chamber. Considering the average of two readings was determined concentration of spores in 100 ml of the suspension of each treatment.

- Statistical analysis

For Mycelial growth variable *C. gossypii*, the data were subjected to regression analysis using the program Sisvar - UFLA v.5.3. As for the effect of variables fungistatic and sporulation collected data were submitted to analysis of variance using the program Sisvar - UFLA versão.5.3.

3- Results and discussion

It was found by regression analysis that there was no reduction in mycelial growth of *C. gossypii* in the Kenaf (*H. cannabinus*) oil concentrations adopted in this work (Figure 1). Data submitted by the fungal growth revealed no statistical difference between the treatment and control oil (Table 1).

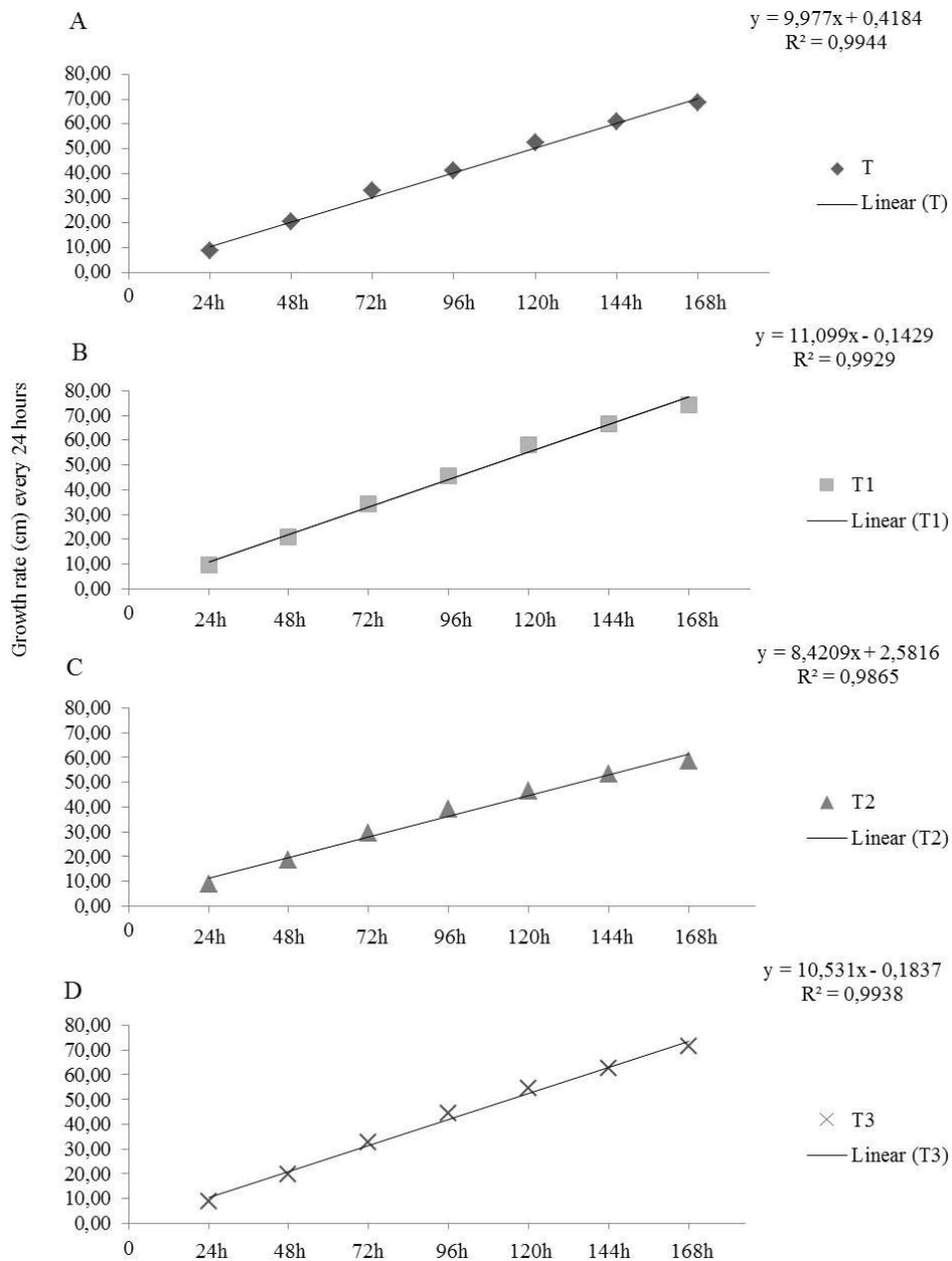


Figure 1: Daily Growth Assessment (cm) of *C. gossypii* amid PDA about Kenaff oil effect at different concentrations. T- Fungus + PDA; T1- fungus + Kenaf 25µl/ ml; T2- fungus + Kenaf 50µl /ml; T3 - fungus + Kenaf 75µl / ml. Regression equation and R2 is displayed for each concentration.

According to Kobayashi et al (2001), oil of kenaf sheets consists of various bioactive molecules such as hydrocarbons, oxygenated compounds,

aldehydes, diterpenes and other. Constitution rich in compounds such as alcohols and terpenes, substances known for having fungicidal activity (Wuryatmo et al., 2003; Cárdenas-ortega et al., 2005) . However, for purposes of this oil, in concentrations of 25, 50 e 75µl/ml, the fungu presented their normal growth until closing plates with seven days after inoculation (Figure 2).

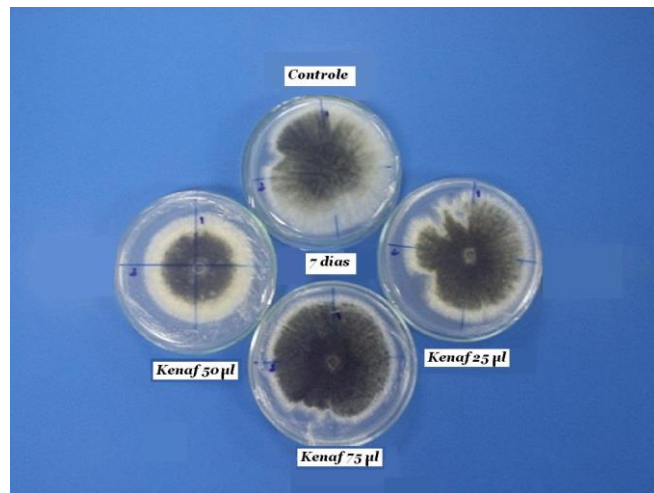


Figure 2: Growth of *C. gossypii* on PDA on Kenaff oil effect at different concentrations.

Although there are few studies on fungicide capacity of kenaf, its oil has been widely studied as to their allelopathic effect, initially identified by weed population reduced around of this species (Russo et al., 1997). These studies have reported reduced species of seed germination as *Amaranthus retroflexus* L., *Lolium multiflorum* Lam., *Lycopersicon esculentum* Mill. e *Cucumis sativus* L. on effect of extracts and oils of this plant (Russo et al., 1997; Webber et al., 2000).

Kenaf oil also had no effect on the production of spores of *C.gossypii* (Table 1) and although reports in Kobayashi et al (2001) *in vitro* studies

demonstrate reduction of growth of *Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. accutatum* on effect oil at kenaf Concentrations from 0.1 ml/ml, even at the highest concentration used in this study (75 uL/ml) the oil did not show fungicidal effect on *C. gossypii* isolated (Table 1).

Table 1. Parameters phytopathological *C. gossypii* effect on 3 kenaf oil concentrations.

Treatment	Rate gro. daily (cm/day)	Spore production (10^5)	Fungistatic effect (cm)		
			2 days	4days	6 days
T	2.68	4.03	2.10	3.47	4.70
T ₁	2.81	4.43	2.00	4.43	4.73
T ₂	2.50	3.63	2.10	3.80	5.30
T ₃	2.75	4.19	2.13	4.43	5.70
C.V. (%)	9.15	2.14	2.32	8.54	10.12

Legenda: T- Fungus + PDA; T1- fungus + Kenaf 25µl/ ml; T2- fungus + Kenaf 50µl /ml; T3 - fungus + Kenaf 75µl / ml. C.V.- Coefficient of variation.

Based on kenaf (*H. cannabinus*) oil composition, rich in alkaloids, terpenes and other ingredients characteristic fungicidal, even this oil showing no control over the *C. gossypii* in present study, it is believed that in higher concentrations that adotas, it can have an effect on this pathogen. Thus is necessary new studies adopt with higher concentrations.

4- References

ABRAPA (Brazilian Association of Cotton Producers), cotton in the world Available in: <http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/Algodao-no-Mundo.aspx>.

Agbor G.A., Oben J.E., Ngogang J.Y. (2005). Haematinic activity of *Hibiscus cannabinus*. Afr. J. Biotechnol., 4(8): 833-837.

Alves M.F., Pereira F.R.A., Andrade A.M., Menezes I.P.P., Hoffmann L.V. e Barroso, P.A.V. (2009). Molecular markers polymorphic between cotton mocó and herbaceous. Rev Cienc Agron. 40: 406-411.

Aerts R.J, Snoeijer W., Van D.E.R., Meijden E. and Verpoorte R. (1991). Allelopathic inhibition of seed germination by *Cinchona* alkaloids. Phytochemistry 30: 2947-2951.

Bonner J. The isoprenoids. In: Bonner, J., Verner, J. E. (Ed.) Plant biochemistry, New York: Academic Press, 1961. p.665-692.

Cárdenas-Ortega N., Zavala-Sánchez M., Aguirrerivera J., Pérez-Gonzalez C., Pérez-Gutiérrez S., (2005).- Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray.- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (11): 4347-4349.

Cia E. e Salgado C.L. (2005). Cotton diseases. In: kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (ed.) Phytopathology Manual: cultivated plant diseases. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 47-48.

Craven L.A., Stewart M.C.D., Brown A. H. D., Grace J.P. (1994). The Australian wild species of *Gossypium*. In: Proceedings of the world cotton research conference, 1. 1994, Brisbane, Australia. Challenging the future. p. 278 – 281.

Edginton L.V., Khew K.L., Barron, G.L. (1971). Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology, v.61, n.1, p.42-44,

Freire E. C., Soares J. J., Farias F. J. C., Arantes E. M., Andrade F. P., Paro H., Laca-Buendia, J. P. (1997). Cotton crop in Mato Grosso. Campina Grande-PB: Embrapa Algodão, 65 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica 23).

Fumagali E., Aparecida R., Gonçalves C., Fátima M., Vidoti G., de Oliveira A., J. (2008). Production of secondary metabolites in cell culture and plant tissues: The example of the genera *Tabernaemontana* and *Aspidosperma*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18(4): 627-641.

Harbone J.B. (1988). *Introduction to ecological biochemistry*. 4. ed. London: Academic Press. Kimati H. et al. (2005). *Manual de fitopatologia*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres,. v. 2, 623 p.

Kobaisy M., Tellez M. R., Webber C. L., Dayan F. E.; Schrader K. K. e Wedge, D. E. (2001). Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. *Journal Agriculture Food Chemistry*. vol. 49. nº 8. pp. 3768 – 3771.

Lara, F.M. (1991). *Plant resistance to insects principles*. 2. ed. São Paulo: Ícone. Marei, G., Rasoul, M.A.A., Abdelgaleil, S.A.M. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pestic Biochem Physiol*, 103:56-61..

Melo R.M.C.A., Melo- Filho P.A., Câmara, M.P.S., Lima W.G., Santos R.C. (2013). Preventive control of cotton ramulosis using clove oil at low concentration. *International Journal of Agricultural Science Research*, 2(3), pp. 060-066.

Mello M.O.; Silva-Filho M.C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Rio de Janeiro, v. 14, n.2, p. 71-81.

Mohamed A., Bhardwaj H., Hamama A., Webber, C. (1995). Chemical composition of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil. *Industrial Crops and Products* 4: 157–165.

Pinheiro, M.M.; Sandroni, M.; Lummerzheim, M.; Oliveira D.E. (1999). The protection of plants against diseases. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, v. 147, p. 1-11.

Rassoli I., Mirmostafa S. A. (2003). Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 2200-2205.

Russo V. M., Cartwright C., Webber C. L. (1997). Mulching effects on erosion of soil beds and on yield of autumn and spring planted vegetables. *Biol. Agric. Hortic.*, 14, 85-93.

Silva T. B. M., Siqueira H. A. A., Oliveira A. C., Torres J. B., Oliveira J. V., Montarroyos P. A. V., Farias M. J. D. C. (2011). Insecticide resistance in Brazilian populations of the cotton leafworm, *Alabama argillacea*. *Crop Prot.*, Guildford, v. 30, n. 9, p. 1156-1161.

Simon J.E., Morales M.R., Phippen W.B., Vieira R.F., Hao, Z. (1999). Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. *In* J Janick, ed, *Perspectives on New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, pp 499–505.

Suassuna N.D., Coutinho W.M. (2011). Management of major diseases of cotton in the Brazilian cerrado. *In*: FREIRE, E.C. (Ed.). *Algodão no Cerrado do Brasil*. 2.ed. Brasília: Abrapa, p.567-612.

Taiz, L. e Zeiger, E. (2004). *Vegetal physiology*. Porto Alegre: Artmed, p.449-484.

Webber C. L., Russo V. M., Myers D. L. (2000). Inhibition of Weed and Vegetable Seed Germination by Allelopathy. *Proceedings of the International Kenaf Association Conference*, Oklahoma City, OK, Feb 24-26,; International Kenaf Association: Ladonia, p35.

Wuryatmo E., Klieber A. e Scott, E.S. (2003). Inhibition of *Citrus* postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 51: 2637-2640.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

A busca por soluções sustentáveis e agroecológicas no combate a pragas e patógenos nas lavouras deu enfoque a diversas pesquisas envolvendo óleos vegetais. Estas pesquisas destacam como vantagem o fato destas substâncias não trazerem riscos ao agricultor e ao meio ambiente constituindo-se numa forma segura e sustentável de controlar o patógeno nas lavouras.

O uso dos óleos vegetais de *M. pulegium* e *O. basilicum*, in vivo, confirmaram-se no presente estudo como uma alternativa de baixo custo e eficácia similar a fungicidas comerciais no controle de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Além disso, a caracterização genética de espécies de plantas medicinais e aromáticas é uma importante atividade para ampliar a utilização dos recursos naturais para estes fins, possibilitando que novos materiais detentores de genes de interesse sejam encontrados e sirvam como base para estratégias de conservação ambiental

O óleo de kenaf (*H. cannabinus*), embora rico em alcalóides, terpenos e outros componentes de característica fungicida não foi eficaz nas dosagens adotada, porém acredita-se que, em concentrações superiores, possa exercer efeito sobre este patógeno.