



Indução de fitoalexinas por preparações de leveduras, *Trichoderma* e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* Stapf.

Micaele Rodrigues de Souza^a, Laiza Priscila dos Santos^a, Alessandra Macedo Barros^{a*}, Gil Rodrigues dos Santos^a, Gleys Kellen Aquino Moraes^a, Luana Fernandes Ferraz^a, Valeria Bastos de Araújo^a, Talita Pereira de Souza Ferreira^a

^a Universidade Federal do Tocantins (UFT), Brasil

* Autor correspondente (macedo46@outlook.com)

INFO

Keywords

resistance
glicoloin
deoxyanthocyanins

Palavras-chaves

resistência
glicoloina
deoxiantocianidinas

ABSTRACT

Induction of phytoalexins by preparations of yeasts, Trichoderma and Cymbopogon citratus Stapf. essential oil

Phytoalexins may be induced by biotic and abiotic agents known as elicitors. In this work, you can evaluate the potential of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf., From the fungus *Trichoderma* sp. and yeast for phytoalexin induction in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) and soybean cotyledons (*Glycine max* L.) mesocotyls. As yeast *Sacharomyces cerevisiae*, *Sacharomyces boulardii* and fungus *Trichoderma* sp. were tested on samples 0.5; 5; 25; 50; 75 and 100%. *Cymbopogon citratus* Stapf oil. at 625, 1250, 2500, 5000 and 7500 µg / mL configurations. The trade product *acorda*® was used as a positive control for soybean testing and *Biozyme*® for sorghum. Sterile distilled water was tested negative for testing on cultures as well as cultures. As two resistance induction methodologies in different sera are not as follows: in the first the mesocotyls were excised 0.5 cm above the listener node and application tubes, we applied 1 mL of the sample to be tested. The second time the seedlings are sprayed 2 mL of the samples are tested in different sizes. All evaluated substances promote or accumulate phytoalexins in soy and sorghum. Oil treatment was the most efficient, however, in the case of sorghum, as high oil temperatures caused inhibition of seedling growth. The second sorghum resistance induction methodology yields the best results of the first one due to the large number of phytoalexins and the possibility of observing the seedling reaction to each treatment.

RESUMO

As fitoalexinas podem ser induzidas por agentes bióticos e abióticos conhecidos como eliciadores. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o potencial do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* Stapf., do fungo *Trichoderma* sp. e de leveduras na indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e cotilédones de soja (*Glycine max* L.). As leveduras *Sacharomyces cerevisiae*, *Sacharomyces boulardii* e o fungo *Trichoderma* sp. foram testados nas concentrações 0,5; 5; 25; 50; 75 e 100%. O óleo de *Cymbopogon citratus* Stapf. nas concentrações de 625, 1250, 2500, 5000 e 7500 µg/mL. O produto comercial *acorda*® foi utilizado como testemunha positiva para os testes em soja e o *Biozyme*® para sorgo. Água destilada esterilizada foi testemunha negativa para os testes em ambas as culturas. As duas metodologias de indução de resistência em sorgo diferiram-se no seguinte: na primeira os mesocótilos foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubos, contendo 1 mL da amostra a ser testada. Na segunda as plântulas receberam aspersão de 2 mL das amostras a serem testadas em diferentes concentrações. Todas as substâncias avaliadas promoveram o acúmulo de fitoalexinas em soja e sorgo. O tratamento com o óleo foi o mais eficiente, porém, no caso do sorgo, as altas concentrações de óleo provocaram inibição no crescimento da plântula. A segunda metodologia de indução de resistência em sorgo gerou melhores resultados que a primeira devido ao grande acúmulo de fitoalexinas e à possibilidade de observação da reação da plântula a cada tratamento.

INTRODUÇÃO

Na agricultura, as doenças causadas nas culturas por fungos, bactérias e vírus podem causar perda de rendimento bastante elevado. Muitas estratégias têm sido desenvolvidas para evitar os danos causados por esses agentes patogênicos, como por exemplo, técnicas de evasão, rotação de culturas, manejo do solo, nutrição de plantas e uso de variedades resistentes. Além disso, produtos químicos são amplamente aplicados nas plantações, porém, especialmente na agricultura orgânica, é necessário substituir tais produtos por métodos biológicos de controle de doenças e pragas (Tamm et al., 2011).

Dessa forma, compostos derivados de plantas com atividade antimicrobiana são cada vez mais explorados para uso na preservação e melhoria da qualidade dos alimentos (Ejike, Gong e Udenigwe, 2013). Muitos mecanismos de defesa das plantas contra microrganismos patogênicos envolvem a produção de metabolitos secundários, que podem ser constitutivos ou induzíveis (Pedras e Ahiahonu, 2005). Os constitutivos são substâncias que já estão presentes nos tecidos sadios das plantas em altas concentrações e as induzíveis são substâncias produzidas em decorrência de algum estresse sofrido pela planta (Fadini et al., 2004; Thaler et al., 1999).

As fitoalexinas são substâncias induzíveis de defesa das plantas e têm sido estudadas há mais de um século (Peters, 2006). Os agentes de origem biótica ou abiótica que são capazes de induzir a resposta de defesa nas plantas contra patógenos são chamados de eliciadores (Stangarling et al., 2010). Dentre estes estão os microrganismos como por exemplo leveduras e os óleos essenciais, definidos como compostos voláteis que são meios não favoráveis para o crescimento de diversas bactérias e fungos (Bazarani e Rohloff 2016; Dorman e Deans, 2000; Zanardo, Pascholati e Fialho, 2009).

Muitas pesquisas já foram feitas mostrando o potencial de leveduras no controle de doenças em plantas de soja, milho, sorgo, eucalipto, maracujá e pepino (Stangarlin et al., 2010; Zanardo, Pascholati e Fialho, 2009). E entre os óleos essenciais citados como agentes antifúngicos está o óleo de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão) que é reconhecido também pelas suas propriedades anti-inflamatórias, repelente para mosquito e inseticida (Costa et al., 2016). Sendo assim, neste trabalho, o potencial de diversos tratamentos, tais como preparações do fungo *Trichoderma* sp., leveduras e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* Stapf. foram analisados como indutores de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de células de *Saccharomyces boulardii*

A obtenção das células de *S. boulardii* foi realizada a partir do produto comercial Florent 200® (Cifarma). Com esse propósito, 100 mg do produto foram colocados em 10 mL de água destilada esterilizada e, dessa suspensão, foi feito o isolamento em meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar) sólido e a incubação no escuro a 36 °C por 4 dias. Após 4 dias, as células isoladas foram repicadas para 200 mL de meio de cultivo YEPG (dextrose-peptona-extrato de levedura) líquido esterilizado e mantidas sob agitação (150 rpm), no escuro e a 36 °C durante 7 dias.

Obtenção de células de *Saccharomyces cerevisiae*

As células de *S. cerevisiae* foram obtidas a partir do produto comercial Fermento Biológico seco instantâneo (Fleischmann®). Para tanto, 100 mg do produto foram colocados em 10 mL de água destilada esterilizada e, a partir dessa suspensão, foi realizado o isolamento em meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar) sólido e incubação no escuro a 36 °C por 4 dias. Após 4 dias, os isolados de *S. cerevisiae* foram repicados para 200 mL de meio de cultivo YEPG (dextrose-peptona-extrato de levedura) líquido esterilizado e mantidos sob agitação (150 rpm), no escuro e a 36 °C durante 7 dias.

Obtenção de células de *Trichoderma* sp.

O produto comercial Agrotrich® (Agrosafra Sementes) foi utilizado como fonte para a obtenção das células de *Trichoderma* sp. Para isso, 100 mg do produto foram colocados em 10 mL de água destilada esterilizada e, a partir dessa suspensão, foi realizado o isolamento em meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar) sólido e incubação no escuro a 36 °C por 4 dias. Após 4 dias, os isolados foram repicados para 200 mL de meio de cultivo BDA líquido esterilizado e mantidos sob agitação (150 rpm), no escuro e a 36 °C durante 7 dias.

Obtenção do óleo essencial de *C. citratus* Stapf.

As folhas de *C. citratus* Stapf. foram coletadas no Campus de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins. Empregou-se o método de hidrodestilação e utilizou-se um aparelho de Clevenger modificado adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 1 litro (Guimarães et al., 2008). O processo de extração foi realizado em um período de 2

horas, mantendo a solução em ebulição. Após, coletou-se o hidrolato, que foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 900 g por 5 minutos. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro âmbar.

Preparação das amostras a serem testadas

As células de *S. cevevisiae*, *S. bouldardii* e *Trichoderma* sp. foram preparadas nas concentrações de 0,5; 5; 25; 50; 75 e 100%, enquanto que o óleo de *C. citratus* Stapf. foi utilizado na concentração de 625, 1250, 2500, 5000 e 7500 µg/mL.

Obtenção da testemunha positiva

Para a obtenção do controle positivo, utilizou-se quatro ativadores de resistência sistêmica comerciais, sendo eles Phytogard®, Biozyme®, Yantra® e Acorda®. Todos foram testados na concentração de 1250 µg/mL.

Ensaio para a indução de fitoalexina em cotilédones de soja

Sementes de soja (*Glycine max* L.), cultivar Monsoy 8644-IPRO (Intacta®), foram desinfetadas por 10 min em hipoclorito de sódio 1% e lavadas em água destilada. Posteriormente, as sementes foram semeadas em duas bandejas contendo areia autoclavada (à 121°C e 1 atm por 20 min). As bandejas foram deixadas em casa de vegetação por 10 dias e os cotilédones foram destacados em seguida para a realização dos ensaios (Stangarlin et al., 2010).

Os cotilédones foram colocados em placas de petri de 120 mm de diâmetro, onde cada placa continha três cotilédones e duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. Cada cotilédone foi cortado em pequenos fragmentos, os quais foram tratados com 100µL das amostras a serem testadas. As placas permaneceram incubadas à 25°C, no escuro, por 20 h. Na sequência, os cotilédones foram pesados e colocados em erlenmeyers contendo 10 mL de água destilada esterilizada, os quais foram deixados sob agitação orbital (150 rpm) durante 1h para que ocorresse a extração dos pigmentos (Meinerz et al., 2008; Stangarlin et al., 2010).

Por fim, os cotilédones foram retirados dos erlenmeyers e a absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro à 285 nm (Meinerz et al., 2008). Água destilada esterilizada foi utilizada como testemunha negativa e o ativador de resistência comercial Acorda® foi a testemunha positiva (Stangarlin et al., 2010).

Ensaio para a indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (metodologia 1)

Sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], cultivar Buster (Atlântica Sementes®), foram colocadas em hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos e posteriormente foram lavadas em água destilada esterilizada. Em seguida, as sementes foram depositadas em folhas de papel de germinação umedecidas sendo enroladas e encubadas no escuro à 28 °C no período de 4 dias para que ocorresse a germinação (Stangarlin et al., 2010).

Após esse período, as plântulas formadas foram primeiramente expostas a luz por 4 h para que houvesse a paralização da elongação dos mesocótilos. Na sequência, os mesocótilos foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubos para microcentrífugas (3 mesocótilos por tubo) contendo 1 mL da amostra a ser testada. Os tubos foram mantidos sob a luz fluorescente, a 25 °C, por 60 h. Posteriormente, os mesocótilos foram retirados dos tubos, pesados e colocados em novos tubos contendo 1,4 mL de metanol acidificado 80% (0,1% HCl; v/v). Estes foram mantidos resfriados a 4 °C por 96 h para a extração dos pigmentos. A absorbância foi lida a 480 nm (Nicholson, Jamil, Snyder e Lue, 1988; Motoyama, Schwan-estrada, Stangarlin, Fiori-tutida e Scapim, 2003; Stangarlin et al., 2010). Água destilada esterilizada e o ativador de resistência comercial Biozyme® foram utilizadas como testemunhas negativas e positivas, respectivamente.

Ensaio para a indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (metodologia 2)

Sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], cultivar Buster (Atlântica Sementes®), foram colocadas em hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos e posteriormente foram lavadas em água destilada esterilizada. Em seguida, as sementes foram depositadas em folhas de papel de germinação umedecidas e as folhas foram enroladas e colocadas dentro de beckers na posição vertical. Em seguida, as sementes foram incubadas no escuro a 28 °C no período de 4 dias para que ocorresse a germinação (Stangarlin et al., 2010).

Após esse período, as plântulas formadas foram primeiramente expostas a luz por 4 h para que a houvesse a paralização da elongação dos mesocótilos. Na sequência, as plântulas receberam aspersão de 2 mL das amostras a serem testadas em diferentes concentrações. Água destilada esterilizada foi utilizada como testemunha negativa, enquanto que o ativador de resistência comercial Biozyme® foi a testemunha positiva. As plântulas foram mantidas

sob a luz fluorescente, a 25 °C, por 60 h. Posteriormente, os mesocótilos foram retirados, excisados, pesados e colocados em tubos para microcentrífuga contendo 1,4 mL de metanol acidificado 80% (0,1% HCl; v/v). Estes foram mantidos resfriados a 4 °C por 96 h para a extração dos pigmentos (BO-NALDO, 2005). A absorbância foi, então, lida a 480nm (Nicholson, Jamil, Snyder e Lue, 1988; Stangarlin et al., 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção da testemunha positiva

Dentre os ativadores de defesa das plantas testados, o Acorda® foi o que induziu maior produção

de gliceolina em cotilédones de soja, induzindo 59,99% mais do que o ativador menos eficiente, Yantra® (Figura 1A). Dessa maneira, utilizou-se o produto comercial Acorda® como testemunha positiva para os testes em soja.

Para os testes com sorgo, determinou-se que o ativador Biozyme® gerou melhores resultados para a indução de flavonoides 3-deoxiantocianidinas em ambas as metodologias, sendo que os gráficos demonstraram comportamentos semelhantes. Assim como no teste com a soja, Yantra® foi o produto com menor indução em sorgo (Figura 1B e C). Portanto, para os testes com sorgo, Biozyme® foi utilizado como testemunha positiva.

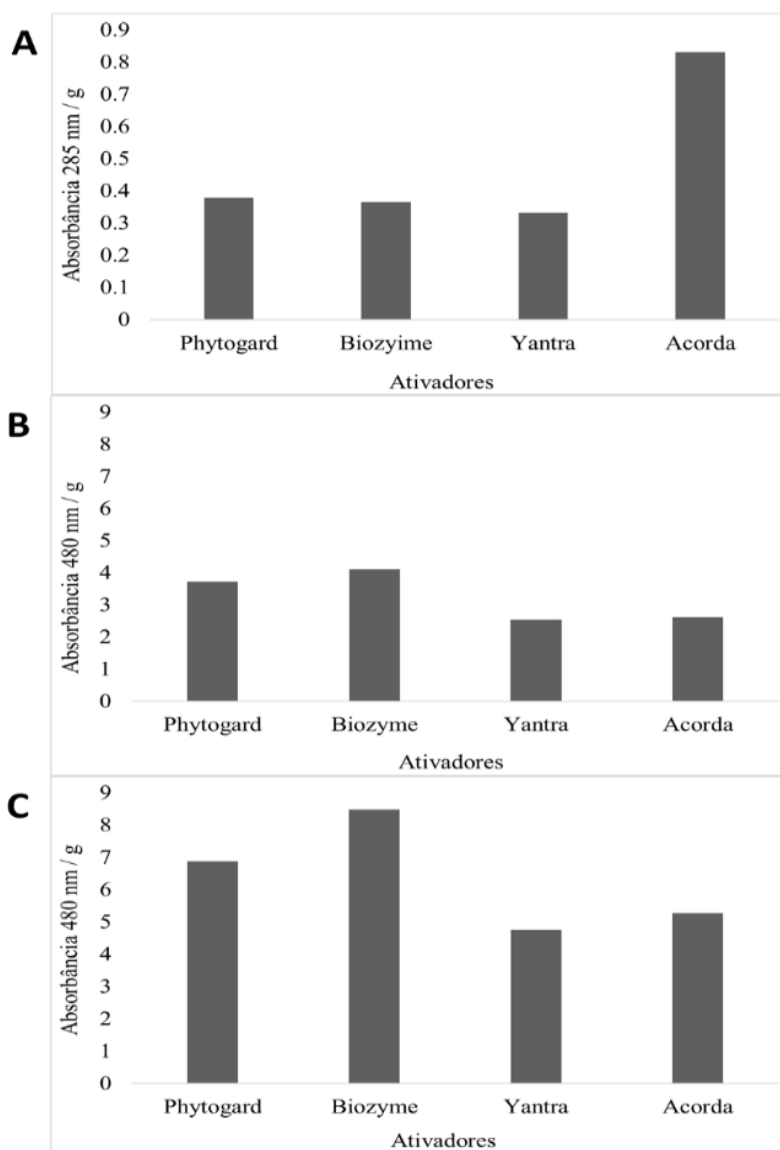


Figura 1 – (A) Produção de gliceolina em cotilédones de soja, (B) flavonoides 3-deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo pela metodologia 1 (C) e metodologia 2, submetidos a tratamentos com indutores de resistência sistêmica comerciais.

Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

Os testes realizados com *Trichoderma* sp., *S. cerevisiae* e *S. boulardii* neste trabalho mostraram que houve indução de gliceolina nos cotilédones de soja em todos os testes, sendo que quando submetidos à concentração 100%, o *Trichoderma* sp. e *S. cerevisiae* foram mais eficientes e obtiveram valores semelhantes. Esses valores também foram similares à testemunha positiva (Figura 2).

O teste realizado com *Trichoderma* sp. apresentou o efeito dose-dependente com ajuste da equação de 1º grau e R^2 para 0,8745, comprovando que a produção de gliceolina aumenta em função da concentração de células. Para *S. boulardii*, o efeito indutor somente ocorreu nas concentrações 0,5% e 100%, sendo que as outras mostraram resultados semelhantes à testemunha negativa (Figura 2C).

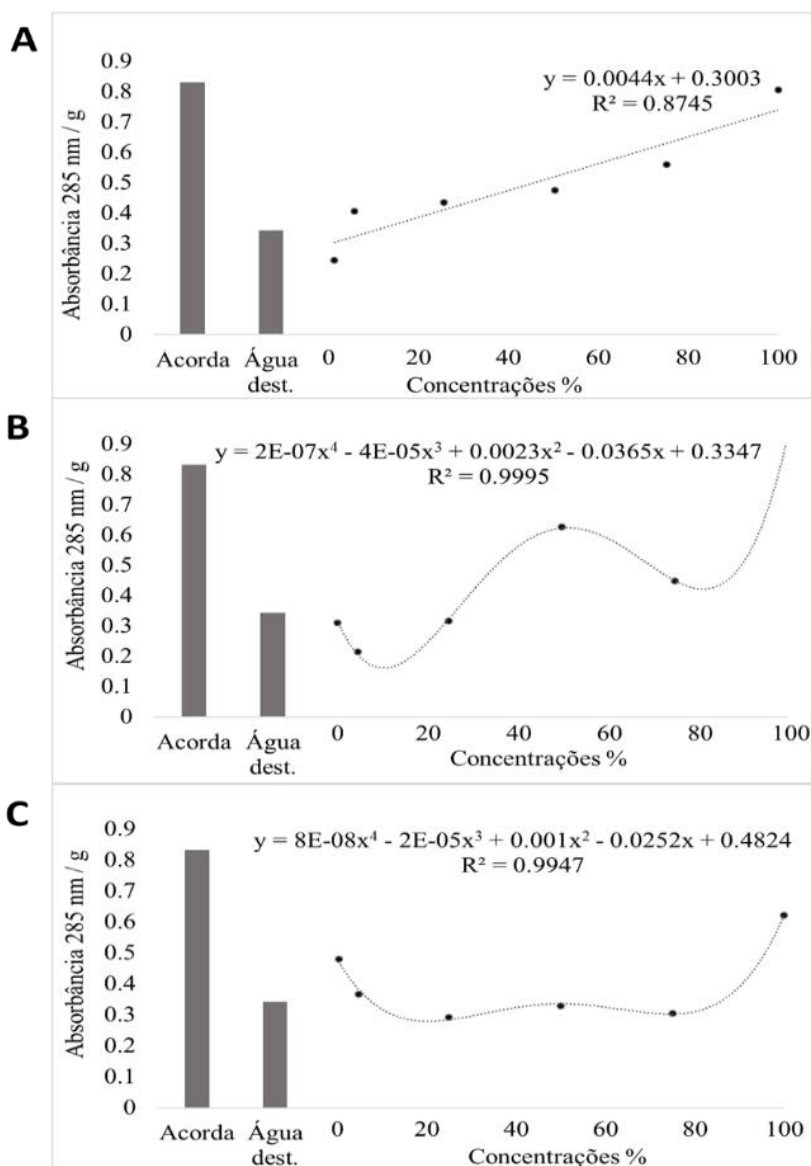


Figura 2 – (A) Produção de gliceolina em cotilédones de soja submetidos a tratamento com *Trichoderma* sp., (B) *Sacharomyces cerevisiae* (C) e *Sacharomyces boulardii*.

O ensaio feito com o óleo de *C. citratus* Stapf. apresentou efeito dose-dependente, com ajuste da equação de 1º grau e R^2 para 0,9049. Dentre todas as concentrações testadas, 7500µg/mL mostrou melhor resultado, com uma indução de fitoalexinas

95,22% maior que a obtida no teste com a menor concentração. Além disso, a maior concentração de óleo de *C. citratus* Stapf. induziu 82,33% mais fitoalexinas que à testemunha positiva (Figura 3).

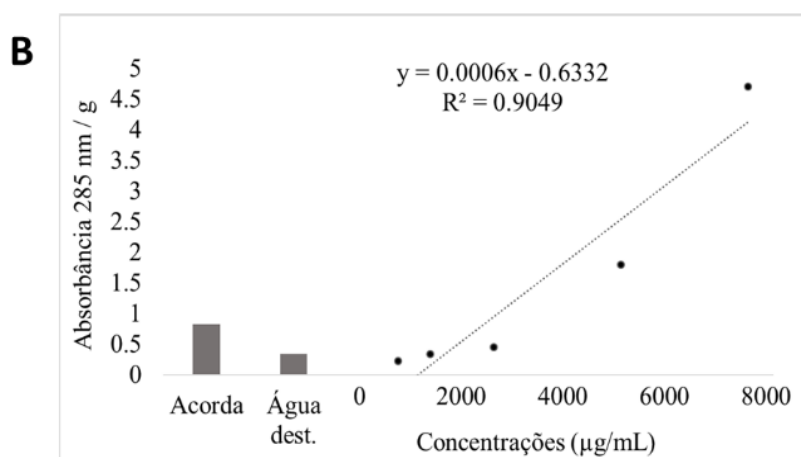


Figura 3 - Produção de gliceolina em cotilédones de soja submetidos a tratamento com óleo de *Cymbopogon citratus* Stapf.

Entre todos os eliciadores testados em cotilédones de soja, o que demonstrou melhor efeito de indução foi o óleo de *C. citratus* Stapf.

O óleo de *C. citratus* Stapf. foi o melhor eliciador em mesocótilos de sorgo, produzindo 73,33% mais flavonoides 3-deoxiantocianidinas que pela metodologia 1 na sua maior concentração.

Muitos trabalhos têm apresentado o potencial de células de leveduras, especialmente *Sachamomyces* sp., como eliciadoras na indução de fitoalexinas contra fitopatógenos em diversas plantas. Zanardo e seus colaboradores (2009) conseguiram demonstrar que a *S. cerevisiae* possui frações que podem ser utilizadas para a indução de resistência à antracnose, doença causada em pepinos pelo fungo *Colletotrichum lagenarium*.

E estudos voltados para a cultura da cebola também mostraram uma moderada redução na severidade da doença ferrugem da *Botrytis*, causada por *Botrytis allii*, ao se utilizar a *S. cerevisiae* como um dos tratamentos. E o mesmo ocasionou um aumento significativo no teor total de fenol, indicando um correlação com a redução do desenvolvimento de patógenos, já que tais compostos são substâncias tóxicas aos patógenos, outra possibilidade é a resistência ter sido gerada pela alteração do pH do citoplasma da célula vegetal, que é alterado com o aumento do conteúdo fenólico (Khaledi, Taheri, Tarighi2015; Hussein et al., 2018).

Em 2010, Stangarlin e seus colaboradores identificaram a levedura *S. boulardii* e seus derivados como capazes de induzir a produção de fitoalexinas em sorgo e soja. Alguns autores, sugerem também que o fungo *Trichoderma* sp. é capaz de produzir substâncias voláteis que inibem o crescimento micelial de uma diversidade de organismos causadores de doenças em plantas (Bomfim et al., 2010; Khaledi e Taheri, 2016), o que comprova os nossos

resultados.

Quanto aos óleos essenciais, os que exibiram os melhores resultados em nossa pesquisa, são apresentados na literatura como um produto promissor no controle de doenças em várias culturas de plantas (de Souza Ferreira et al., 2018; Fira, Dimkić, Berić, Lozo e Stanković, 2018; Borah et al., 2019; Silva et al., 2019). Apesar das dificuldades de se testar esse produto no campo e do seu sistema de produção ainda ser limitado, os óleos possuem a vantagem de não oferecer risco à saúde humana e não promover contaminação ambiental (De Souza et al., 2019). Dessa forma, os óleos essenciais são uma alternativa ao uso de agrotóxicos (Amri, Hamrouni, Hanana, Jamoussi e Lebdi, 2014)

Especificamente o óleo de *C. citratus* Stapf. é rico em citral e limoneno. DeLima Guimarães e seus colaboradores (2011) confirmaram em seus estudos, que esses componentes possuem ação fungitóxica, corroborando com os resultados obtidos em nossas análises. Outro estudo comprovou a acentuada atividade antifúngica apresentada pelos óleos voláteis de *C. citratus* e *Matricaria recutita*, que quando comparados o óleo essencial do *C. citratus* Stapf. apresentou melhores resultados para o controle do crescimento micelial de *Cladosporium cladosporioides* (Dias, Lopes, Pinto, Moura e Nascimento, 2010).

Em 2008, Kumar e seus colaboradores apresentaram resultados que comprovaram a importância da característica hidrofóbica dos óleos essenciais e de seus constituintes na capacidade de interação com a camada lipídica das membranas celulares dos microrganismos. Essa característica é responsável por alterações na estrutura das membranas, causando a morte dos fungos (Kumar, Shukla, Singh, Prasad e Dubeyet, 2008).

Produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (metodologia 1)

Os testes realizados com os microrganismos *Trichoderma* sp., *S. cerevisiae* e *S. boulardii* mostraram que todos produzem um efeito indutor, porém mais eficiente do que o causado na soja. Os resultados foram relativamente semelhantes para todas

as concentrações de cada microrganismo. Nenhum dos eliciadores foi identificado como dose-dependente, porém, para *S. cerevisiae* e *S. boulardii* obteve-se melhores resultados nas suas maiores concentrações (Figura 4).

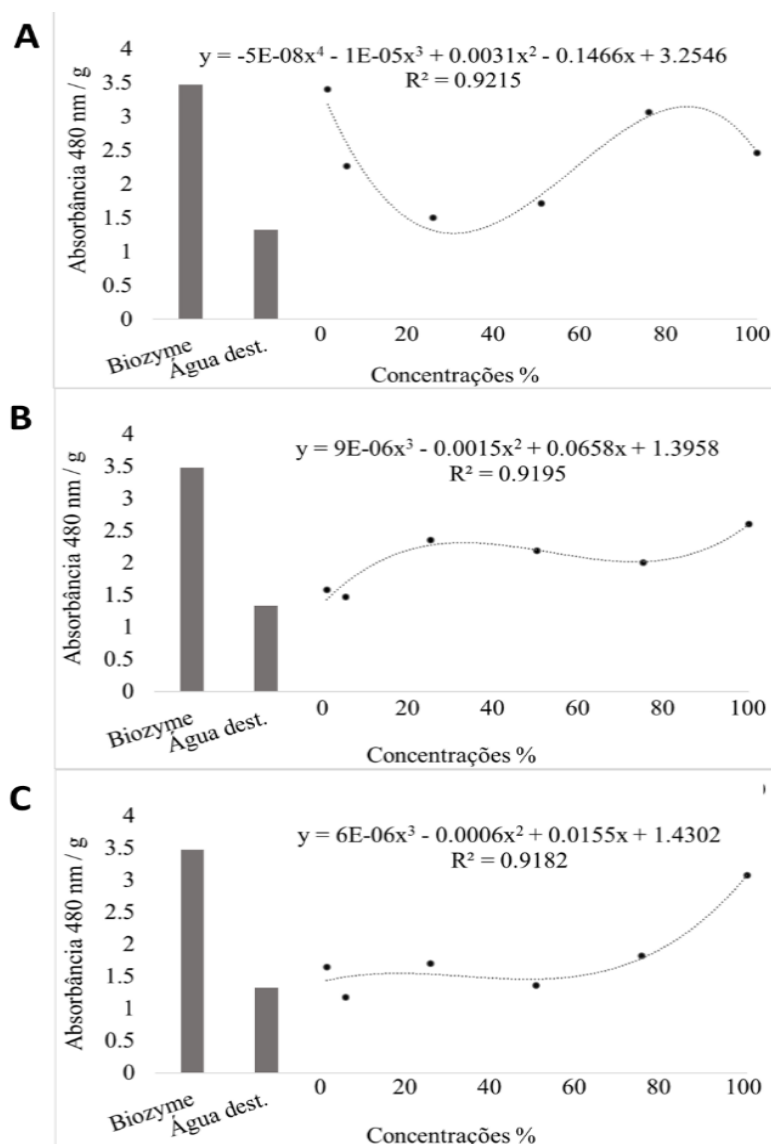


Figura 4 - (A) Produção de flavonoides 3-deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo submetidos a tratamento com *Trichoderma* sp., (B) *Sacharomyces cerevisiae* (C) e *Sacharomyces boulardii* pela metodologia 1.

Assim como ocorreu nos testes com cotilédones de soja, todas as concentrações do óleo de *C. citratus* Stapf. mostraram efeito indutor, sendo caracterizado como dose-dependente, com ajuste da equação de 1º grau e R^2 para 0,8272. Na concentração 7500 µg/mL, o óleo de *C. citratus* Stapf. demons-

trou efeito de indução muito maior que a testemunha positiva (Figura 5).

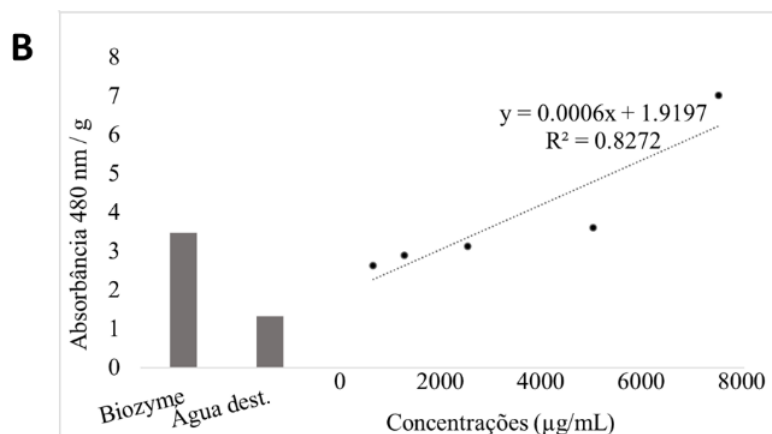


Figura 5 - Produção de flavonoides 3-deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo submetidos a tratamento com óleo de *Cymbopogon citratus* Stapf. pela metodologia 1.

Produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (metodologia 2)

Nos testes com sorgo utilizando a segunda metodologia, observou-se a ocorrência de efeito indutor para os três tratamentos realizados em todas as concentrações. O melhor efeito indutor nesse caso foi o da *S. bouldardii* na concentração 100%, o qual apresentou acúmulo de 57,64% mais fitoalexinas que à testemunha positiva. Apenas o teste feito com

S. bouldardii apresentou efeito dose-dependente, com ajuste da equação de 1º grau e R^2 para 0,802 (Figura 6).

Em comparação com a metodologia 1, os gráficos gerados para os tratamentos com *S. cerevisiae* e *S. bouldardii* se comportaram de maneira relativamente semelhante, porém, o acúmulo de fitoalexinas foi muito maior na metodologia 2 (Figura 6B e C).

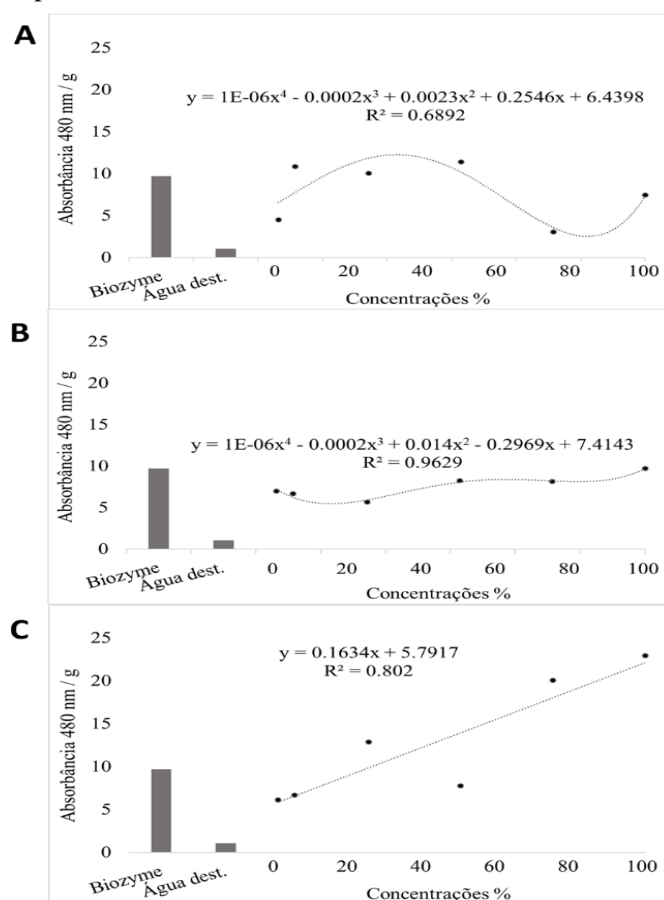


Figura 6 - (A) Produção de flavonoides 3-deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo no tratamento com *Trichoderma* sp., (B) *Sacharomyces cerevisiae* (C) e *Sacharommyces bouldardii* pela metodologia 2.

Para os testes com o óleo essencial, não houve efeito dose-dependente. Todas as concentrações foram capazes de induzir produção de fitoalexinas em sorgo, sendo que a maior concentração apresentou valor 63,08% maior que à testemunha positiva (Figura 7). Entretanto, os tratamentos com maiores

concentrações (5000 e 7500 µg/mL) do óleo de *C. citratus* Stapf. causaram inibição no crescimento da planta, indicando que essas concentrações são inviáveis para o controle de patógenos em plantas por causa de sua fitotoxicidade (Figura 8).

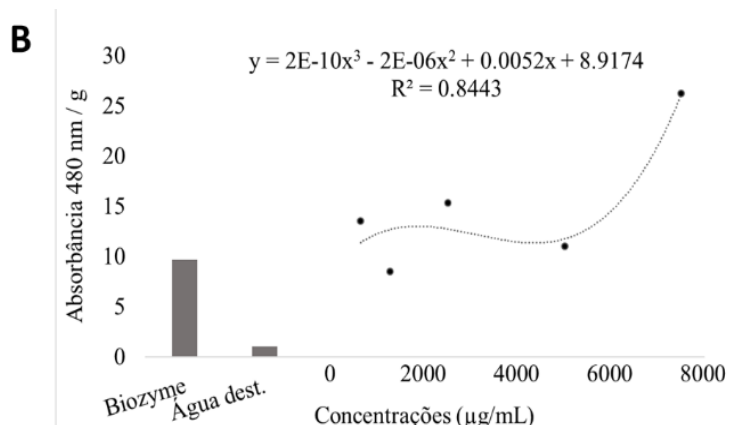


Figura 7 - Produção de flavonoides 3-deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo submetidos a tratamento com óleo de *Cymbopogon citratus* Stapf. pela metodologia 2.

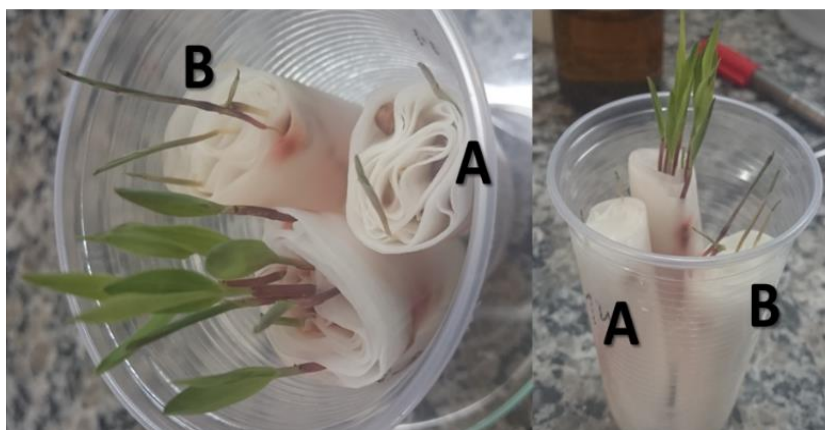


Figura 8 - (A) Plântulas de sorgo submetidas à concentração de 5000 e (B) 7500 µg/mL de óleo de *Cymbopogon citratus* Stapf.

Geralmente, a produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo ocorre em função do aumento da concentração de células de *S. cerevisiae* presentes nas preparações. Todavia, Wulff e Pascholati (1999) observaram em seus experimentos que um comportamento não linear ocorreu em resposta ao aumento de concentração das frações parcialmente purificadas da levedura. Apesar desse comportamento, foi possível observar que a produção de fitoalexinas em sorgo é maior na concentração mais alta.

O teste de indução de fitoalexinas em sorgo pela metodologia 2 se mostrou mais eficiente no acúmulo dessas substâncias. Provavelmente, essa eficiência se deve ao fato de que os tratamentos foram aplicados às plântulas em desenvolvimento, fa-

zendo com que elas demonstrassem um comportamento mais próximo do que possivelmente ocorreria se a aplicação fosse feita no campo. Além disso, fazendo uso dessa metodologia foi possível observar o comportamento da planta em relação aos tratamentos aplicados, podendo avaliar se o tratamento seria viável ou não.

CONCLUSÕES

Os eliciadores testados neste trabalho promoveram o acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. O tratamento que mais induziu resistência em ambas as culturas foi o óleo essencial de *C. citratus* Stapf., porém foi observado uma inibição no crescimento do sorgo submetido à altas concentrações deste óleo na metodologia 2. A

metodologia 2 para indução de fitoalexinas em sorgo gerou melhores resultados quando comparada com a metodologia 1 devido ao grande acúmulo de flavonoides 3-deoxiantocianidinas e à possibilidade de observação da reação da plântula à cada tratamento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte da Universidade Federal do Tocantins na realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMRI, I.; HAMROUNI, L.; HANANA, M.; JAMOSSI, B.; LEBDI, K. Essential oils as biological alternatives to protect date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Chilean journal of agricultural research*, 74(3), 273-279, 2014. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392014000300004>
- BAZARGANI, M.; ROHLOFF, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>
- BOMFIM, M.P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; de ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I.V.B.; DIAS, N.O. (2010). Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo Antagonistic effect in vitro and in vivo of *Trichoderma* spp. to *Rhizopus stolonifer* in yellow passion fruit. *Summa Phytopathologica*, 36(1), 61-67. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000100011>
- BONALDO, S. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum*. 2005. 166f. Tese de Doutorado (Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BORAH, A.; PAW, M.; GOGOI, R.; LOYING, R.; SARMA, N.; MUNDA, S.; LAL, M. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial and in-vitro cytotoxic efficacy of essential oil of *Curcuma caesia* Roxb. leaves: An endangered medicinal plant of North East India. *Industrial Crops and Products*, 129, 448-454, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.035>
- COSTA, G.; FERREIRA, J.P.; VITORINO, C.; PINA, M.E.; SOUSA, J.J.; FIGUEIREDO, I.V.; BATISTA, M.T. Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves astropicais anti-inflammatory agents. *Journal of ethnopharmacology*, 178, 222-228, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.016>
- De LIMA GUIMARÃES, L.G.; das GRAÇAS, C.M.; SOUZA, P.E., de ANDRADE, J.; VIEIRAS, S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agronômica*, 42(2), 464-472, 2011.
- De SOUZA FERREIRA, T.P.; MOURÃO, D.D.S.C.; dos SANTOS, G.R.; de LIMA GUIMARÃES, L.G.; PIRES E.C. F.; SANTOS, W.F.; de SOUZA AGUIAR, R.W. Fungistatic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. against *Curvularia lunata*. *African Journal of Agricultural Research*, 13(14), 704-713, 2018. doi: 10.5897/AJAR2018.12977.
- De SOUZA, M.F.C.; PENTEADO, A.L., de SOUZA, D.R.C.; de QUEIROZ, S.C.D.N. Atividade antimicrobiana "in vitro" de óleos essenciais contra patógenos de peixes/"In vitro" antimicrobial activity of essential oils against fish pathogens. *Brazilian Journal of Development*, 5(10), 17911-17921, 2019.
- DIAS, L.P.; LOPES, A.S.; PINTO, C.E.M.; MOURA, H.F.N.; NASCIMENTO, V.L.V. Fungitoxicidade do óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e da camomila (*Matricaria recutita*) sobre o fitopatógeno *Cladosporium cladosporioides*. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. V CONNEPI-2010. 2010.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- EJIKE, C.E.; GONG, M.; UDENIGWE, C.C. Phytoalexins from the Poaceae: Biosynthesis, function and prospects in food preservation. *Food research international*, 52(1), 167-177, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.012>
- FADINI, M.A.; LEMOS, W.P.; PALLINI, A.; VENZON, M.; MOURÃO, S.A. Herbivoria de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) induz defesa direta em maracujazeiro?. *Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. 2004.
- FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285, 44-55, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- GUIMARÃES LGDL, CardosoMDG, Zacaroni LM, Lima RK, PimentelFA, Morais AR. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). *Quim Nova*, 31(6), 1476-1480, 2008.
- HUSSEIN, M. M.; ABO-ELYOUSR, K. A.; HASSAN, M. A.; HASHEM, M.; HASSAN, E. A.; ALAMRI, S. A. Induction of defense mechanisms involved in disease resistance of onion blight disease caused by *Botrytis allii*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 80, 2018. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0085-5>
- KHALEDI, N.; TAHERI, P.; TARIGHI, S. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as maiores bean pathogens. *Journal of applied microbiology*, 118(3), 704-717, 2015. <https://doi.org/10.1111/jam.12730>
- KHALEDI, N.; TAHERI, P. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Protection Research*, 56(1), 21-31, 2016. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0004>
- KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRASAD, C.S.; DUBEY, N.K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fun-

- gal infestation of food commodities. *Innovative food science & emerging technologies*, 9(4), 575-580, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.12.005>
- MEINERZ, C.C.; FORMIGHIERI, A.P.; SCHWAN-ESTRADA, R.F.; DIETERIC, H.C.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R. Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por derivados de aveia (*Adiantum capillus-veneris* L.). *Rev. Bras. Plantas Med*, 10(2), 26-31, 2008.
- MOTOYAMA, M.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; SCAPIM, C. A. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 25(2), 491-496, 2003. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v25i2.2062>
- NICHOLSON, R.L.; JAMIL, F.F.; SNYDER, B.A.; LUE, W.L.; HIPSKIND, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33(2), 271-278, 1988. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(88\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0885-5765(88)90027-6)
- PEDRAS, M.S.C.; AHIAHONU, P.W. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry*, 66(4), 391-411, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.12.032>
- PETERS, R.J. Uncovering the complex metabolic network underlying diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and other cereal crop plants. *Phytochemistry*, 67(21), 2307-2317, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.009>
- SILVA, D.C.; ARRIGONI-BLANK, F.M.; BACCI, L.; BLANK, A.F.; FARO, R.R.N.; PINTO, J.A.O.; PEREIRA, K.L.G. Toxicidade e alterações comportamentais de óleos essenciais de genótipos de *Eplingiella fruticosa* e seus principais compostos para *Acromyrmex balzani*. *Crop Protection*, 116, 181-187, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.11.002>
- STANGARLIN, J.R.; SCHULZ, D.G.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; KUHN, O.J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 77(1), 91-98, 2010.
- TAMM, L.; THÜRIG, B.; FLIESSBACH, A.; GOLTTLIEB, A.E.; KARAVANI, S.; COHEN, Y. Elicitors and soil management to induce resistance against fungal plant diseases. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 58(3-4), 131-137, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.njas.2011.01.001>
- THALER, J.S.; FIDANTSEF, S.S.; DUFFEY, R.M. BOS-TOCK. Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. *J. Chem. Ecol.* 25: 1597-1609, 1999.
- WULFFNA, PASCHOLATISF. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Fitopatologia Brasileira*, 24(3), 428-435, 1999.
- ZANARDONMT, PASCHOLATISF, FIALHO MB. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(11), 1499-1503, 2010.