

**Controle da germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary com óleos essenciais provenientes de 17 espécies vegetais**

**Control of mycelial and carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary with essential oils from 17 plant species**

**Control de la germinación micelial y carpogénica de *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary (lib.) con aceites esenciales de 17 especies vegetales**

Recebido: 02/12/2020 | Revisado: 10/12/2020 | Aceito: 13/12/2020 | Publicado: 15/12/2020

**Thayllane de Campos Siega**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8170-9895>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

E-mail: [thayllanedecampos@hotmail.com](mailto:thayllanedecampos@hotmail.com)

**Caliandra Bernardi**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2584-175X>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

E-mail: [caliandra.bernardi@hotmail.com](mailto:caliandra.bernardi@hotmail.com)

**Maristela dos Santos Rey**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9323-0395>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

E-mail: [maris\\_rey@yahoo.com.br](mailto:maris_rey@yahoo.com.br)

**Américo Wagner Junior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5081-5281>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

E-mail: [americowagner@hotmail.com](mailto:americowagner@hotmail.com)

**João Henrique Pietrobom**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3023-6765>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

E-mail: [jhpietrobom@gmail.com](mailto:jhpietrobom@gmail.com)

**Sérgio Miguel Mazaro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2787-9409>

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

E-mail: [sergio@utfpr.edu.br](mailto:sergio@utfpr.edu.br)

## Resumo

A *Sclerotinia sclerotiorum* é fitopatógeno que causa a doença conhecida como podridão de Sclerotinia, presente em inúmeras culturas. Para maior aprofundamento do conhecimento da biologia deste fitopatógeno, ferramenta importante é a avaliação da viabilidade dos escleródios. Como existem óleos essenciais sendo utilizados para o controle de fitopatógenos poder-se-ia testá-los sobre a germinação miceliogênica e carpogênica deste patógeno. O trabalho foi realizado utilizando-se a aplicação de 17 óleos essenciais, juntamente com as testemunhas, com e sem Tween. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 19 tratamentos, quatro repetições. A germinação miceliogênica foi realizada em meio BDA e a incubação, em câmara de crescimento do tipo BOD a 18 °C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações das germinações foram realizadas nas 24, 48, 72 e 96 horas após o início da incubação. A germinação carpogênica foi induzida em solo esterilizado e a incubação em câmara de crescimento com temperatura de  $18 \pm 2$  C°, fotoperíodo de 12 horas e umidade do solo a 100 % da capacidade de campo. Os óleos de *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Thymus vulgaris* apresentaram maior eficiência na germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*.

**Palavras-chave:** Controle alternativo de patógeno; MEV; Fungo.

## Abstract

*Sclerotinia sclerotiorum* is a phytopathogen that causes the disease known as Sclerotinia rot, present in many crops. It is necessary to deep the knowledge of the biology of the phytopathogen, it being an important tool is the evaluation of the viability of sclerotia. Since essential oils are being used for the control of phytopathogens, it could be tested in the myceliogenic and carpogenic germination of *S. sclerotiorum* together with controls with and without Tween. For myceliogenic germination, experiment was carried out in BDA medium and incubation in a BOD-type growth chamber at 18 ° C with 12-hour photoperiod. Germination evaluations were performed at 24, 48, 72 and 96 hours after the start of incubation. Carpogenic germination was induced in sterile soil and incubation in a growth chamber with a temperature of  $18 \text{ }^{\circ} \text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ} \text{C}$ , photoperiod of 12 hours and soil humidity at 100% of field capacity. The experimental design was completely randomized with 19 treatments, four repetitions. The oils of *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Thymus vulgaris* showed greater efficiency in the myceliogenic and carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*.

**Keywords:** Alternative pathogen control; SEM; Fungus.

## Resumen

*Sclerotinia sclerotiorum* es un fitopatógeno que causa la enfermedad conocida como pudrición por *Sclerotinia*, presente en numerosos cultivos. Para profundizar aún más el conocimiento de la biología del fitopatógeno, una herramienta importante es la evaluación de la viabilidad de los escleródios. Dado que se están utilizando aceites esenciales para el control de fitopatógenos, se podría probar en la germinación miceliogénica y carpogénica de *S. sclerotiorum* junto con los controles, con y sin Tween. Para la germinación miceliogénica, se realizó ensayo en medio BDA e incubación en cámara de crecimiento tipo DBO a 18 °C, con fotoperiodo de 12 horas. Las evaluaciones de germinación se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas después del inicio de la incubación. Se indujo la germinación carpogénica en suelo estéril e incubación en cámara de crecimiento con temperatura de 18°C ± 2°C, fotoperíodo de 12 horas y humedad del suelo al 100% de la capacidad de campo. El diseño experimental fue completamente al azar con 19 tratamientos, cuatro repeticiones. Los aceites de *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Thymus vulgaris* mostraron mayor eficiencia en la germinación miceliogénica y carpogénica de *Sclerotinia sclerotiorum*.

**Palabras clave:** Controle alternativo; MEV; Hongo.

## 1. Introdução

A *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é agente etiológico da doença conhecida como mofo branco. Os danos causados são severos e podem acometer vasta lista de espécies hospedeiras, tornando-o fungo de importância econômica devido as perdas que pode ocasionar nas culturas atacadas, tendo como principais a disseminação da doença para áreas saudáveis e a morte de plantas atacadas (Juliatti et al., 2015).

Os sintomas e sinais característicos dessa doença são a podridão úmida coberta por micélio branco, que pode ser encontrado na superfície do solo e/ou tecido da cultura atacada. Com o avanço da doença, escleródios podem se formar, sendo estes responsáveis pela sua sobrevivência (Garcia et al., 2012, Cardoso, 1990).

Através dos escleródios, tem-se a germinação miceliogênica, no qual hifas irão infectar a planta e/ou germinação carpogênica, precursora de apotécios, responsáveis pela emissão de ascósporos em áreas infectadas (Görger, 2009).

Para Barbosa et al. (2012), os métodos de controle, por serem limitados, devem ser tomados em conjunto, adotando-se por exemplo, práticas de prevenção que envolvem uso de sementes certificadas, rotação de cultura, entre outras técnicas, cuja finalidade é dificultar a

entrada do patógeno ou ao menos reduzir o potencial de inóculo.

Os produtos químicos, apesar de muito utilizados vêm trazendo preocupação quanto as questões de saúde humana e problemas ambientais. A demanda por plantas livres de agrotóxicos é crescente, fazendo com que seja motivada a demanda por novas medidas de proteção das plantas contra as doenças (Souza Zanella et, al. 2015) de maneira a não trazer malefícios ao ambiente e aos seres humanos.

Portanto, pesquisas relacionadas ao potencial fungicida de substâncias naturais são relevantes, pois podem contribuir para atender tal demanda e servir como controle alternativo de doenças nas culturas de importância agrícola.

As substâncias produzidas por algumas plantas atuam como agentes fungistáticos ou fungicidas (Antunes & Cavacob, 2010), como já constatado por Bernardi et al. (2019) utilizando óleos essenciais para controle de *Sclerotinia sclerotiorum*.

O uso de óleos essenciais de plantas medicinais, aromáticas e condimentares têm-se mostrado alternativa segura, viável e eficiente no controle de fungos fitopatogênicos (Silva et al., 2009). Neste sentido, empresas vêm comercializando óleos essenciais cujas uma das finalidades pode ser usada no controle de patógenos. Todavia, importante primeiro identificar qual óleo de determinada espécie apresenta potencialidade para uso visando atender tal demanda para específico patógeno.

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de controle sobre a germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary com uso de óleos essenciais provenientes de 17 espécies.

## 2. Metodologia

Foram realizados dois experimentos, conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Câmpus Dois Vizinhos. O primeiro experimento avaliou-se a germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum* e o segundo a germinação carpogênica do mesmo patógeno.

Os isolados de *S. sclerotiorum* foram obtidos de colônia pura, retirados da micoteca do referido Laboratório. Os escleródios foram produzidos a partir da repicagem de discos de micélio de 5 mm do fungo, em fluxo laminar, para placas de Petri® com tampa esterilizadas com meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar) devidamente autoclavado. As placas foram incubadas a 18°C, em fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Decorrido este período, os escleródios formados, foram retirados das placas e armazenados por 15 dias a - 5°C em papel

alumínio (geladeira) até a sua utilização nos experimentos (15 dias).

Para avaliação, foram utilizados óleos essenciais das espécies *Zingiber officinale* Roscoe, *Laurus nobilis* L., *Citrus reticulata* Blanco, *Artemisia vulgaris* L., *Eucalyptus citriodora* Hook, *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry, *Melaleuca alternifolia* Cheel, *Thymus vulgaris* (L), *Citrus sinensis* L, *Citrus latifolia* Tanaka, *Psidium guajava* Linn, *Cyperus articulatus* L., *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Eugenia uniflora* L, *Casearia sylvestris* Sw, *Schinus terbinthifolius* Raddi e *Cinnamomum zeylanicum* Blume, todos obtidos a partir do processo de hidrodestilação oriundos da empresa “Cacalia – Produtos Naturais”. Adotaram-se o uso de água destilada com e sem Tween como testemunhas.

A germinação miceliogênica foi realizada em meio de cultura BDA. Os escleródios foram previamente desinfestados em álcool 70% por 2 minutos, seguido por hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos, sendo posteriormente lavados em água autoclavada por 1 minuto e mantidos em ambiente asséptico no interior de câmara de fluxo laminar para secagem. Foram aplicados 15 µl dos óleos essenciais em papel filtro autoclavado (1 cm<sup>2</sup>), fixado na tampa superior da placa de Petri (Bernardi et al, 2019). Após, foram depositados sobre o meio de cultura cinco escleródios com tamanho entre 1 e 2 mm, estando dispostos para germinação de hifas. A incubação foi realizada em câmara de crescimento do tipo BOD a 18 ° C e fotoperíodo de 12 horas, com avaliações sendo realizadas às 24, 48, 72 e 96 horas após o início da incubação. Foi utilizado microscópio estereoscópico, observando-se o surgimento das hifas características do fungo. Em cada avaliação foi determinado o número de escleródios que apresentava germinação de hifas.

A germinação carpogênica foi realizada em solo Nitossolo vermelho distroférico típico com textura argilosa (Marasca, et al., 2013), coletado na própria universidade. Após a coleta, o solo foi autoclavado em temperatura de 121° C e pressão de trabalho de 1,2 Kgf/cm<sup>2</sup>. A autoclavagem foi realizada em 3 dias consecutivos, todas utilizando período de uma hora cada. Amostras de 200 g de solo foram alocadas em caixas gerbox com tampa (11 cm x 11 cm x 3,5 cm).

O experimento foi montado utilizando-se fitas de papel filtro de 2 cm, embebidas em 30 µl de óleo essencial puro. As fitas foram fixadas na tampa da caixa Gerbox, de modo a tratar volatilmente os escleródios, segundo metodologia proposta por Bernardi et al, (2019). Foram utilizados 15 escleródios por caixa Gerbox. Para testemunha, as fitas de papel filtro foram embebidas em água destilada e esterilizada. Logo em seguida, as caixas foram incubadas à temperatura de 18°C, em fotoperíodo de 12 horas por 30 dias.

Determinou-se o percentual médio de escleródios que emitiram estipes e o número

total de estipes, o percentual médio de escleródios que germinaram apotécios e o número total de apotécios. A primeira avaliação foi realizada após a emissão do primeiro estipe, até completarem-se 40 dias de incubação. Efetuou-se o enterrio de 10 escleródios à profundidade de aproximadamente 0, 2 cm, deixando-se sempre, metade do escleródio para fora do substrato. Após o enterrio, lâmina de água de 6,0 mm foi aplicada por caixa, deixando a umidade do solo próximo à capacidade de campo, através do uso de irrigação, segundo metodologia proposta por Crato et al. (2013). As caixas com tampa, foram incubadas em temperatura de 18° C, em fotoperíodo de 12 horas, por 40 dias. As avaliações de viabilidade foram efetuadas através do número de apotécios, além da contagem do número de estipes e de apotécios formados por caixa Gerbox. A primeira avaliação foi efetuada após a emissão do primeiro estipe, até o momento de completarem 40 dias de incubação. Foram considerados viáveis os escleródios que germinaram pela produção de micélio e subsequente, produção de escleródios, segundo metodologia proposta por Pereira et al. (2018).

Utilizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a superfície das hifas do fungo submetidos ao tratamento pelos óleos de *C. sylvestris*, *E. uniflora* e *M. alternifolia*, procedendo-se estudo mais detalhado das possíveis alterações morfológicas nas estruturas do fungo. Estes óleos foram escolhidos ao acaso para realização deste teste. A análise no MEV foi realizada apenas dos óleos citados, devido as falhas decorrentes da produção das imagens nos outros tratamentos. Para isso, o isolado puro da micótica foi repicado em placa de Petri®, retirando discos do micélio, nos quais foram transferidos para o meio da placa, devidamente esterilizadas com meio de cultura BDA. Após a repicagem, na tampa da placa foram colocados os 15µl dos principais óleos descritos. As placas foram vedadas e levadas para a BOD por 48 horas. Para as análises, as amostras utilizadas foram cuidadosamente fixadas através de fita adesiva de cobre sobre suporte de alumínio e alocadas no equipamento.

Foram realizadas as imagens no microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM 3000, operando em 15 kV, com ampliações de 200, 800 e 1000x. As alterações observadas nas imagens foram devidamente descritas nos resultados. Foram avaliados os danos segundo a presença de vacúolos, desorganização dos conteúdos celulares, diminuição da nitidez da parede celular, fragmentação das hifas, turgência das hifas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos pelos óleos essenciais utilizados, usando-se quatro repetições, sendo considerado cada caixa gerbox como unidade experimental. Foi feito realizado o teste de normalidade de Shapiro Wilk. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e de

agrupamento teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa Assistat 7.6 beta.

## 2. Resultados e Discussão

Os óleos essenciais utilizados mostraram efeito significativo para germinação miceliogênica, nas 48, 72 e 96 horas. Observou-se, nas primeiras vinte e quatro horas a ausência de germinação, ocorrendo apenas nas 48 horas com formação de dois grupos, estando os óleos de maior contaminação no grupo formado pelas testemunhas com e sem Tween e, oriundos de *Melaleuca alternifolia*, *Citrus sinensis*, *Psidium guajava* e *Eugenia uniflora*. Nas 72 horas, repetiu-se a formação de dois grupos, estando presentes como de maior contaminação os óleos de *Zingiber officinale*, *Laurus nobilis*, *Citrus reticulata*, *Artemisia vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus sinensis*, *Psidium guajava*, *Eugenia uniflora*, *Casearia sylvestris*, juntamente com as testemunhas (Tabela 1).

Observou-se nos resultados, que o efeito inibitório para germinação miceliogênica, em alguns óleos, manteve-se somente das primeiras 48 horas, como forma de atrasá-la, mas não evita-la, assim como ocorreu nas 96 horas, quando houve a formação de três grupos, com o primeiro, de maiores médias formado pelos óleos *Zingiber officinale*, *Artemisia vulgaris* e pelas testemunhas; o segundo de médias intermediárias pelos óleos *Laurus nobilis*, *Citrus reticulata*, *Syzygium aromaticum*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus sinensis*, *Psidium guajava* e *Eugenia uniflora* e, o terceiro formado pelos demais (Tabela 1). A formação destes três grupos parece supor certa estabilidade no comportamento da porcentagem de germinação decorrido determinado tempo em alguns óleos.

Todavia, destaca-se o uso dos óleos de *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus* e *Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus vulgaris* e *Schinus terebinthifolius*, nos quais não permitiram germinação miceliogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* nos tempos de avaliação ou quando ocorreram foram baixas de maneira a não permitirem diferenças entre a formação dos grupos.



**Tabela 1** – Germinação miceliogênica (%) de *S. sclerotiorum* de acordo com o óleo essencial aplicado e avaliados em quatro tempos distintos.

Tratamentos	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Testemunha	0 a*	40 a	40 a	95 a
Testemunha com Tween	0 a	25 a	50 a	95 a
<i>Zingiber officinale</i>	0 a	0 b	60 a	90 a
<i>Laurus nobilis</i>	0 a	0 b	30 a	55 b
<i>Citrus reticulata</i>	0 a	0 b	45 a	70 b
<i>Artemisia vulgaris</i>	0 a	0 b	55 a	85 a
<i>Eucalyptus citriodora</i>	0 a	0 b	0 b	0 c
<i>Syzygium aromaticum</i>	0 a	0 b	55 a	65 b
<i>Melaleuca alternifolia</i>	0 a	30 a	40 a	70 b
<i>Thymus vulgaris</i>	0 a	0 b	0 b	5 c
<i>Citrus sinensis</i>	0 a	35 a	50 a	55 b
<i>Citrus latifolia</i>	0 a	0 b	0 b	15 c
<i>Psidium guajava</i>	0 a	35 a	65 a	75 b
<i>Cyperus articulatus</i>	0 a	0 b	0 b	20 c
<i>Cymbopogon citratus</i>	0 a	0 b	0 b	0 c
<i>Eugenia uniflora</i>	0 a	30 a	40 a	50 b
<i>Casearia sylvestris</i>	0 a	10 b	25 a	25 c
<i>Schinus terbinthifolius</i>	0 a	0 b	0 b	5 c
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0 a	0 b	0 b	0 c
CV%	0.00	25.15	30.80	25.43

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autores.

A tabela mostra que os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Schinus terbinthifolius* e *Cinnamomum zeylanicum* afetam o desenvolvimento vegetativo do fungo *S. sclerotiorum*. *Scrivanti et al.* (2003) também observaram potencial do óleo essencial de *Schinus terbinthifolius*, demonstrando 95% de inibição da germinação miceliogênica, o que corrobora com os resultados do presente estudo e confirma atividade antifúngica desse óleo para *Sclerotinia sclerotiorum*, como já ocorreu para *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus* e *Trichoderma* spp.

No presente trabalho, o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* demonstrou inibição da germinação miceliogênica de 35%. *Guynot et al.*, (2003) mostraram o efeito inibitório desse mesmo óleo in vitro, inibindo o crescimento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium corylophilum*, *Eurotium amstelodami*.

Em trabalho de *Medice et al.* (2007), foi constatado redução na severidade da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), cuja variação foi de 35% a 62%, após as plantas



serem tratadas com óleo de *E. citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *nim* e *Thymus vulgaris* a 3000 mg L<sup>-1</sup>, nos quais inibiram eficientemente a germinação miceliogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum* até 96 horas de avaliação. Os efeitos antibiótico, antifúngico e anti-helmíntico do timol e do carvacrol, presentes no óleo essencial de *Thymus vulgaris* já haviam sido comprovados por Diniz et al. (2003) e Neeman et al. (1995). Outros constituintes majoritários como citronelau (*Eucaliptus citriodora*), eugenol (*Syzygium aromaticum*), citral (*Cymbopogon citratus*) e o monoterpene limonemo (*Schinus terebinthifolius*) também foram descritos como substâncias antimicrobianas (Olivo et al., 2013; Sarto & Junior, 2014; Oliveira Junior et al., 2013).

Com relação ao efeito dos óleos na germinação carpogênica, obteve-se efeito significativo na emissão dos estipes e formação de apotécios nos escleródios (Tabela 2). Para o percentual médio de escleródios que emitiram estipe houve a formação de seis grupos, sendo o de maior média agrupando somente a testemunha sem Tween e de menores médias o grupo composto pelos óleos de *Cymbopogon citratus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia uniflora* e *Casearia sylvestris*, com valores nulos para emissão de estipe (Tabela 2).

Para a variável emissão total de estipe houve a formação de cinco grupos, estando também a testemunha com água e sem Tween no grupo de maior média e os óleos de *Cymbopogon citratus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia uniflora* e *Casearia sylvestris* no grupo de menor valor (Tabela 2).

Segundo Bernardi et al. (2019), os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* e *Cymbopogon citratus*, reduziram o tamanho de escleródios formados a partir do micélio do fungo *S. sclerotiorum* evidenciando o poder fungistático dos óleos citados, traçando paralelo com o presente estudo.

Quanto ao percentual médio de escleródios que germinaram apotécios obteve-se a formação de sete grupos, agrupando a testemunha com Tween (40,83%) como de maior valor e os óleos de *Citrus sinensis*, *Syzygium aromaticum*, *Corymbia citriodora*, *Thymus vulgaris*, *Psidium guajava*, *Schinus terbinthifolius*, *Cymbopogon citratus*, *Cyperus articulatus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia uniflora* e *Casearia sylvestris* no grupo de menor média, com valores nulos para a variável descrita.

Na germinação total de apotécios formou-se seis grupos, mas repetiu-se o agrupamento de maior e menores médias com os mesmos tratamentos descritos para o percentual médio de escleródios que germinaram apotécios (Tabela 2).

Todos os óleos essenciais, que para a variável anterior apresentaram valores nulos, mantiveram o seu comportamento para germinação total de estipe, com exceção, do óleo

essencial de *Citrus reticulata* (0,25%). Estes óleos demonstraram para efeito volátil, melhores resultados, comprovando o poder fungicida dos óleos testados.

**Tabela 2** – Percentual médio de escleródios que emitiram estipes, emissão total de estipes, percentual médio de escleródios que emitiram apotécios e emissão total de apotécios de acordo com o óleo essencial aplicado em *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tratamentos	Escleródios que emitiram Estipe (%)	Emissão Total de Estipe	Escleródios que emitiram Apotécios (%)	Emissão Total de Apotécios
<i>Testemunha</i>	78.33 a	27.25 a	60.00 a	17.75 a
<i>Testemunha com Tween</i>	70.00 b	16.75 b	40.83 b	14.00 b
<i>Citrus sinensis</i>	17.77 e	3.50 d	0.00 g	0.00 f
<i>Syzygium aromaticum</i>	24.42 d	11.00 c	0.00 g	0.00 f
<i>Corymbia citriodora</i>	13.33 e	4.00 d	0.00 g	0.00 f
<i>Thymus vulgaris</i>	11.67 e	3.75 d	0.00 g	0.00 f
<i>Laurus nobilis</i>	28.33 d	12.25 c	13.58 d	3.25 e
<i>Psidium guajava</i>	11.11 e	3.75 d	0.00 g	0.00 f
<i>Citrus latifolia</i>	50.00 c	18.25 b	27.83 c	8.50 c
<i>Artemisia vulgaris</i>	55.00 c	16.75 b	5.86 e	2.75 e
<i>Schinus terbinthifolius</i>	53.33 c	17.75 b	0.00 g	0.00 f
<i>Melaleuca alternifolia</i>	50.00 c	16.50 b	11.67 d	5.75 d
<i>Citrus reticulata</i>	13.33 e	3.00 d	4.86 f	0.25 f
<i>Zingiber officinale</i>	30.00 d	10.00 c	10.00 d	3.00 e
<i>Cymbopogon citratus</i>	0.00 f	1.00 e	0.00 g	0.75 f
<i>Cyperus articulatus</i>	16.52 e	3.25 d	0.00 g	0.00 f
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0.00 f	0.00 e	0.00 g	0.00 f
<i>Eugenia uniflora</i>	0.00 f	0.00 e	0.00 g	0.00 f
<i>Casearia sylvestris</i>	0.00 f	0.00 e	0.00 g	0.00 f
CV%	14.08	25.60	21.43	37.46

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autores.

A tabela demonstra, que os óleos essenciais, têm efeito controlador no fungo estudado. Sendo que, os melhores resultados foram obtidos pelos óleos de que mostraram maior efeito no desenvolvimento do fungo foram o de *Cinnamomum zeylanicum* e *Eugenia uniflora*, *Casearia sylvestris*. Isso demonstra que, os óleos essenciais permitem que ocorra alterações nos lipídeos da parede celular, membrana plasmática e mitocôndria, devido a sua capacidade de repelir água, causando alterações nestas estruturas (Zambonelli et al., 1996), ou até levando a morte do fungo.

Os ascósporos podem germinar no exterior de tecidos saudáveis, mas não tem a capacidade de contaminar a planta sem fonte de nutriente exógena (Inglis & Boland, 1990). Geralmente, o ascósporo primeiramente coloniza o material vegetal morto, usando-o como fonte nutritiva. As mais importantes fontes de nutrientes são as flores, que muitas vezes, se encontram caídas sobre folhas, pecíolos ou caules (Crato et al., 2013). Diante disso, mesmo que o óleo essencial de *Citrus latifolia* tenha demonstrado germinação de apotécios, no teste de germinação miceliogênica, ele suprimiu 85% da germinação, retardando temporariamente a germinação carpogênica. Dessa forma, o mesmo pode ter potencial para controlar a doença, pois, quando os ascósporos fossem liberados pelos apotécios, o período mais crítico de ataque que é no florescimento (Venturoso et al., 2015), o que já teria terminado, demonstrando atraso na doença.

Almada-Ruiz et al. (2003) relataram em seu estudo, o controle do agente causal da doença de antracnose em frutos tropicais, através da atividade fungicida do óleo essencial de *Citrus sinensis*. E Sharma e Tripathi (2008), realizando estudos GC-MS desse mesmo óleo essencial (*Citrus sinensis*), encontraram a presença de 10 constituintes químicos, sendo o composto *Limonene*, considerado o principal (84,2%). Neste estudo o tratamento com *Citrus sinensis* demonstrou resultado positivo quanto a germinação de apotécios, pois a mesma foi nula.

As análises morfológicas das hifas de *S. sclerotiorum* por meio do MEV, após aplicação do óleo essencial de *Casearia sylvestris* (Figura 1A) demonstraram após 48 h de incubação, desorganização das hifas, que também pode ser observada na Figura 1B com uso da testemunha, apresentando grande turgescência. Foi possível identificar engrossamento e modificação da integridade das hifas após aplicação do óleo de *C. sylvestris* (Figura 1A). Através da testemunha controle, observou-se que o fungo apresentou septos, espessura e comprimento normais (Figura 1B). Estes dados demonstram o modo de ação do óleo essencial sobre a morfologia do fungo em estudo.

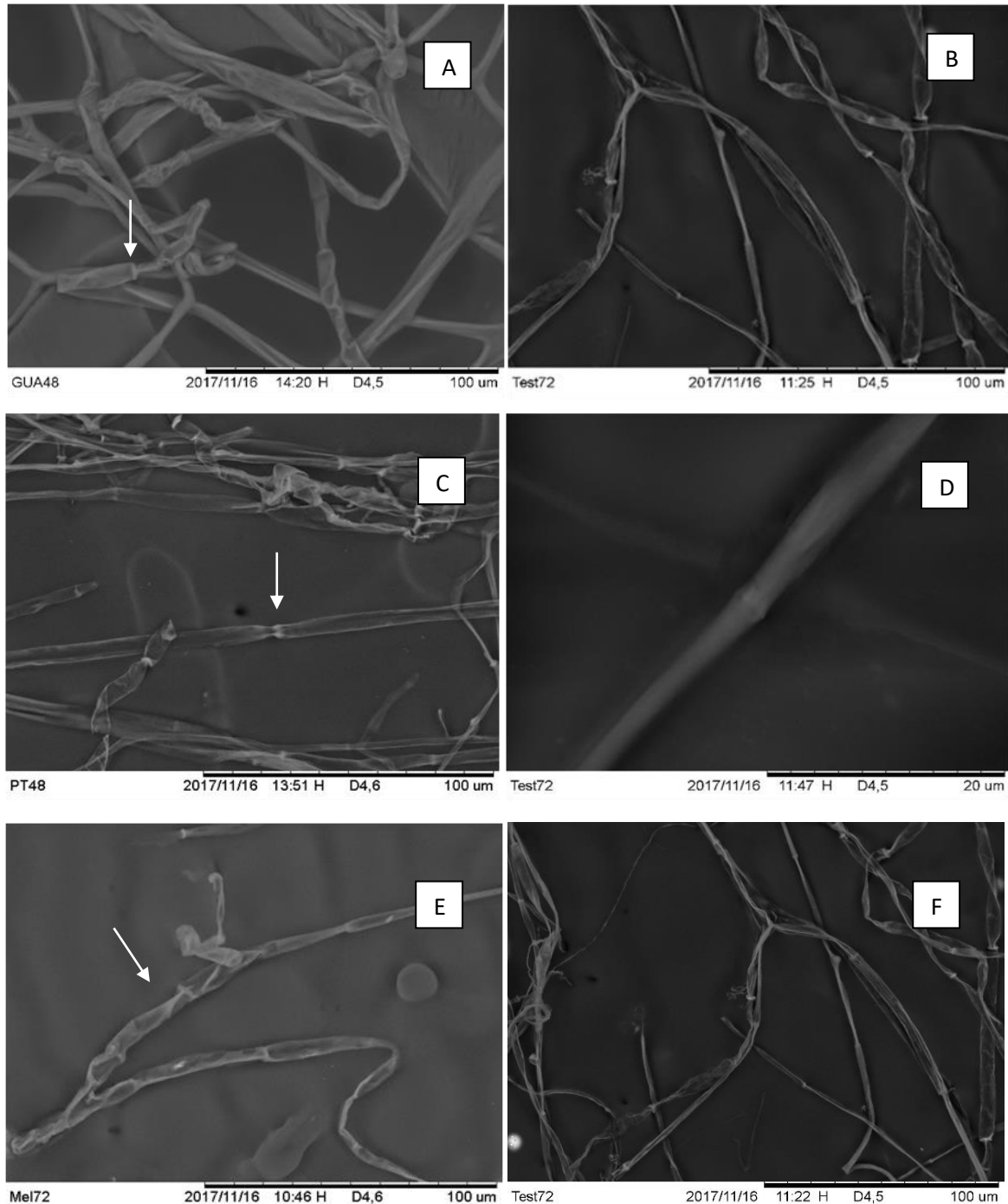
Em estudo de Soyulu et al. (2007), com aplicação dos óleos essenciais de orégano e erva-doce, observaram suprimido crescimento do fungo, com estrutura das hifas apresentando alterações morfológicas quando vistas em MEV. O padrão incomum do crescimento das hifas, bem como as alterações na forma e tamanho das células também foram demonstrados pelo MEV no presente estudo. Sharma e Tripathi (2008), ao utilizarem óleo essencial de *Citrus sinensis*, sobre crescimento e morfogênese de *Aspergillus niger*, observaram por meio do MEV, mudanças na integridade do fungo, perda de citoplasma nas hifas, brotações da ponta das hifas, diâmetro da parede das hifas marcadamente mais finos,

distorcidos e parede celular com ruptura. Estes mesmos autores descreveram que as pontas das hifas se tornaram bifurcadas, achatadas e vazias (em estruturas semelhantes a brotos).

Nas imagens de MEV de amostras de *S. sclerotiorum* tratadas com óleo essencial de *Eugenia uniflora* (Figura 1C) e testemunha controle sem óleo essencial (Figura 1D), após 48 horas de incubação, demonstraram que o uso do referido óleo causou intensa desorganização, engrossamento e turgescência das hifas, conseguindo-se identificar alargamento do micélio, o que modificou sua integridade. Através da testemunha (Figura 1D) notou-se que o fungo possuía hifa paralela, septo íntegro e espessura normal.

Soylu et al. (2006) e Santoro et al. (2007b, 2007a), observaram em seus estudos microscópicos através do MEV, que os óleos essenciais proporcionaram alterações ultraestruturais das células em vários compartimentos, como por exemplo sobre a membrana plasmática, citoplasma (inchaço, desmoronamento, vacuolações e vazamento) e núcleo.

**Figura 1** - Hifas de *S. sclerotiorum*, tratadas com 5  $\mu$ l dos óleos essenciais de *Casearia sylvestris* (A), *Eugenia uniflora* (C) e *Melaleuca alternifolia* (E) em fita de papel filtro, por 48 h de incubação, demonstrando turgescência, engrossamento, modificação da integridade das hifas e aumento da distância entre septos. Tratamento controle (água destilada) (B, D e F), com septos, espessura e comprimento de hifas, normais.



Fonte: Autores.

No presente estudo, as imagens de MEV de amostras de *S. sclerotiorum* tratadas com óleo essencial de *Melaleuca artifolia* não havia apresentado crescimento de hifas até as 48 horas, o que é ponto positivo quanto ao retardamento do crescimento do fungo. Desta forma, após 72 h de incubação, o isolado do fungo submetido ao tratamento com este óleo essencial, apresentou algumas hifas anômalas e afinadas, com maior ocorrência de septos e hifas com turgescência. Para a testemunha (Figura 1F) observou-se hifa paralela, septo íntegro e espessura normal. Os dados deste estudo corroboram os de Dorman e Deans (2000), na qual observa-se o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, sobre as estruturas da parede celular do microrganismo, causando modificações nas mesmas. Para os autores, os óleos alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática, causando alterações no gradiente de íons.

O uso do MEV serviu para comprovar os efeitos benéficos dos óleos essenciais aplicados para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Os dados obtidos através deste trabalho demonstraram a importância de identificar o potencial de tratamentos alternativos com óleos essenciais, auxiliando no entendimento das características do fungo *S. sclerotiorum*, e dando suporte para produção de novos produtos naturais para controle do Mofo Branco.

#### 4. Conclusão

Os óleos de *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Thymus vulgaris* apresentaram maior eficiência na germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. Trabalhos futuros deverão ser realizados, estudando a composição química de cada óleo essencial, e as moléculas atuantes no controle do fungo.

#### Referências

Almada-Ruiz, E., Martínez-Télez, M. Á., Hernández-Álamos, M. M., Vallejo, S., Primo-Yúfera, E., & Vargas-Arispuro, I. (2003). Fungicidal potential of methoxylated flavones from citrus for in vitro control of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose disease in tropical fruits. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 59(11), 1245-1249. <https://doi.org/10.1002/ps.747>

Antunes, M. D. C. & Cavaco, A. M. (2010). The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 351-366. <https://doi.org/10.1002/ffj.1986>

Barbosa, F. R., & Gonzaga, A. D. O. (2012). Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. *Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E)*.

Bernardi, C., Siega, T. D. C., & Rey, M. D. S. (2019). Influência de óleos essenciais no desenvolvimento de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal da Podridão Branca da Haste da Soja. *Summa Phytopathologica*, 45(2), 227-228. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/186890>

Cardoso, J. E. (1990). Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo. *EMBRAPA-CNPAF. Documentos*.

Crato, F. D. (2013). Quantificação de escleródios e germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos da cultura da soja tratada química e biologicamente. Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

Diniz, S., Utumi, H., Bonzanini, F., Queiroz, M. (2003). Controle do fungo *Myrothecium verrucaria* por oleos essenciais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinales*, 6, 60–62.

Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied microbiology*, 88(2), 308-316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>

Garcia, R. Ávila, Juliatti, F. C., & Alves Cassemiro, T. (2012). Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em meio de cultura. *Bioscience Journal - ISSN 1981-3163*, 28(1). Recuperado de: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/8173>

Gorgen, C. A., da Silveira Neto, A. N., Carneiro, L. C., Ragagnin, V., & Junior, M. L. (2010). Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. *Pesquisa*



*Agropecuária Brasileira*, 44(12), 1583-1590. Recuperado de:  
<https://www.scielo.br/pdf/pab/v44n12/v44n12a04.pdf>

Guynot, M. E., Ramos, A. J., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V., & Marin, S. (2003). Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 893-899. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01927.x>

Inglis, G. D., & Boland, G. J. (1990). The microflora of bean and rapeseed petals and the influence of the microflora of bean petals on white mold. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12(2), 129-134. <https://doi.org/10.1080/07060669009501015>

Juliatti, F. C., Figueiró, A. A., Garcia, R. Á., & Santos, J. B. (2015). *Sclerotinia sclerotiorum* e Mofo branco: Estudos básicos e aplicados. *Ver. Anual de Patol. Plantas*, 23, 159-194.

Marasca, I., Gonçalves, F. C., Moraes, M. H., Ballarin, A., Guerra, S. P. S. & Lanças, K. P. (2013). Propriedades físicas de um Nitossolo Vermelho em função dos sistemas de uso e manejo *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, 17(11), 1160–1166,

Medice, R., Alves, E., Assis, R. T. D., Magno Júnior, R. G., & Lopes, E. A. D. G. L. (2007). Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(1), 83-90. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000100013>

Neeman, I. (1995). Effect of essential oil in the phytopathogen *erwinia carotovora*, subsp. *Carotovora* in sterile and non sterile soli, sand and their admixture. *J Appl Bacteriol*, 79, 513-518.

Oliveira Junior, L. F. G., Santos, R. B., Reis, F. O., Matsumoto, S. T., Bispo, W. M. S., Machado, L. P., & Oliveira, L. F. M. (2013). Fungitoxic effect of essential oil from aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI) on *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15(1), 150-157. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000100021>

Olivo, C. J., Agnolin, C. A., Parra, C. L. C., Vogel, F. S. F., dos Santos Richards, N. S. P., de Pellegrini, L. G., & Araujo, L. (2013). Efeito do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*) no controle do carrapato bovino. *Ciencia Rural*, 43(2), 331-337. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013000200023>

Pereira, A.S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de: [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic\\_Computacao\\_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1)

Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G. L., Mendonça, L. Z., & Soares, M. J. (2007). Trypanosoma cruzi: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on Epimastigotes and Trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, 116(3), 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.018>

Santoro, G. F., das Graças Cardoso, M., Guimarães, L. G. L., Salgado, A. P. S., Menna-Barreto, R. F., & Soares, M. J. (2007). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*, 100(4), 783-790. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0326-5>

Sarto, M. P. M. & Junior, G. Z. J. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Uningá Review*, 20, (1), p.98-102.

Scrivanti, L. R., Zunino, M. P., & Zygadlo, J. A. (2003). Tagetes minuta and Schinus areira essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(6), 563-572. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00202-8](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00202-8)

Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological research*, 163(3), 337-344. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>

Silva, A. C. D., Sales, N. D. L. P., Araújo, A. V. D., & Caldeira Júnior, C. F. (2009). In vitro effect of plant compounds on the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolated from

passion fruit. *Ciência e Agrotecnologia*, 33(SPE), 1853-1860. Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/37447551.pdf>

Soylu, E. M., Soylu, S., & Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161(2), 119-128. DOI: 10.1007/s11046-005-0206-z

Soylu, S., Yigitbas, H., Soylu, E. M., & Kurt, Ş. (2007). Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1021-1030. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03310.x>

Venturoso, L. D. R., Bacchi, L. M. A., Gavassoni, W. L., Venturoso, L. A. C., Pontim, B. C. A., & Reis, G. F. D. (2015). Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. *Ciência Rural*, 45(5), 788-793. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140374>

Zambonelli, A., D'Aulerio, A. Z., Bianchi, A., Albasini, A. (1996). Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. *Journal of Phytopathology*, 144(9-10), 491-494. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1996.tb00330.x>

Zanella, C. D. S., Gavassoni, W. L., Bacchi, L. M. A., & Formagio, A. S. N. (2015). Atividade de óleos e extratos vegetais sobre germinação carpopogênica e crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000372013>

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Thayllane de Campos Siega – 16,6%

Caliandra Bernardi – 16,6%

Maristela dos Santos Rey – 16,6%

Américo Wagner Junior – 16,6%

João Henrique Pietrobon – 16,6%

Sérgio Miguel Mazaro – 16,6 %