

CÍCERO AUGUSTO GUIMARÃES FUGA

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS E SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM
VEGETAL PARA O CONTROLE DE *Sclerotium cepivorum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

RIO PARANAÍBA – MINAS GERAIS

2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca UFV - Campus de Rio Paranaíba**

F957p

Fuga, Cicero Augusto Guimarães. 1988-

Prospecção de microorganismos e substâncias de origem vegetal para o controle de *Sclerotium cepivorum* / Cicero Augusto Guimarães Fuga. – Rio Paranaíba, MG. 2013. VII, 43 f. : il. ; 29cm.

Orientador: Everaldo Antônio Lopes.

Dissertação (mestrado) em Agronomia - Universidade Federal de Viçosa.

I. Podridão branca – *Bacillus* spp.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632

CÍCERO AUGUSTO GUIMARÃES FUGA

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS E SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM
VEGETAL PARA O CONTROLE DE *Sclerotium cepivorum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Data de Aprovação: 26 de julho de 2013

Prof. Marcelo Rodrigues dos Reis
(Coorientador)

Prof. Bruno Sérgio Vieira

Prof. Walter Vieira da Cunha

Prof. Everaldo Antonio Lopes
(Orientador)

RIO PARANAÍBA – MINAS GERAIS

2013

A Deus,
À minha família,
Aos meus amigos,
Dedico.

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e compreensão durante todos estes anos de formação. À minha mãe pela educação e ensinamentos da vida. E à minha irmã pelo companheirismo. Com muito carinho agradeço.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba pela oportunidade de desenvolver esta dissertação e aos conhecimentos gerados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos de república, Diego, Diogo e Roney pelo companheirismo, pela ajuda mútua em diversos experimentos e pelos momentos de alegria que me proporcionaram.

Ao professor e orientador Everaldo Antônio Lopes pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, pelos ensinamentos, paciência e amizade que me proporcionaram crescimento profissional e acadêmico.

À todos os professores do programa de Pós-graduação pela sabedoria que souberam transmitir.

Ao professor Walter Vieira da Cunha pela confiança, disponibilização de recursos e do Laboratório de Genética do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) para desenvolver parte deste trabalho.

Ao professor Bruno Sérgio Vieira pelo auxílio na correção do trabalho e pela disposição em sugerir e trocar idéias.

Ao Laboratório Farroupilha e integrantes dessa mesma empresa, Alan Pomella e Robson Luz Costa, por ceder materiais e isolados de *Trichoderma* para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
LITERATURA CITADA.....	4
CAPÍTULO I	
ANTAGONISMO DE <i>Bacillus</i> spp. E <i>Trichoderma</i> spp. A <i>Sclerotium cepivorum</i>	
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
Locais de realização dos experimentos	10
Obtenção do fitopatógeno	11
Isolamento das bactérias a partir do solo.....	11
Antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. a <i>Sclerotium cepivorum</i>	11
Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos por <i>Bacillus</i> spp.	12
Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>Sclerotium cepivorum</i>	13
Produção e influência de metabólitos de <i>Trichoderma</i> no crescimento micelial de <i>S. cepivorum</i>	14
Compatibilidade entre isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
Antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. a <i>Sclerotium cepivorum</i>	15
Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>Sclerotium cepivorum</i>	17
Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos por <i>Bacillus</i> spp.	18
Produção e influência de metabólitos de <i>Trichoderma</i> no crescimento micelial de <i>S. cepivorum</i>	20
Compatibilidade entre isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.....	21
CONCLUSÃO	23
LITERATURA CITADA.....	24

CAPÍTULO II

EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotium cepivorum*

INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
Locais de realização dos experimentos	31
Obtenção do isolado fúngico	31
Preparo dos extratos vegetais	31
Efeito de extratos vegetais sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	32
Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
Efeito dos extratos vegetais sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	33
Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	36
CONCLUSÃO	39
LITERATURA CITADA.....	40

RESUMO

FUGA, Cícero Augusto Guimarães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Prospecção de microrganismos e substâncias de origem vegetal para o controle de *Sclerotium cepivorum***. Orientador: Everaldo Antônio Lopes. Co-orientadores: Marcelo Rodrigues dos Reis e Luiz Antônio Maffia.

A podridão branca, causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum*, é uma das principais doenças das culturas do alho e da cebola em todo o mundo. Na busca por alternativas sustentáveis de manejo de doença, agentes de biocontrole e substâncias presentes em extratos e óleos essenciais de plantas podem ser potencialmente úteis na inibição do crescimento do patógeno. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. e a fungitoxicidade de extratos de plantas e óleos vegetais à *S. cepivorum* ‘in vitro’. No capítulo I foi avaliado o antagonismo de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. a *S. cepivorum* por meio da técnica de confrontação direta e pela produção de metabólitos tóxicos em placas de Petri. Após a seleção dos isolados mais eficientes, testou-se a compatibilidade entre os antagonistas. No capítulo II foi avaliado a fungitoxicidade de extratos aquosos e etanólicos de plantas (arruda, mentrasto, citronela, alho, gengibre e açafrão), e de óleos essenciais (citronela, alecrim, nim e eucalipto citriodora) no crescimento micelial e germinação de escleródios de *S. cepivorum* em placas de Petri. Foram selecionados sete isolados de *Bacillus* spp. e cinco de *Trichoderma* spp. com efeito antagônico a *S. cepivorum*. Todos os antagonistas selecionados agiram por antibiose (produção de metabólitos tóxicos), com diferentes níveis de toxicidade ao patógeno. Alguns antagonistas não apresentaram compatibilidade entre si. Todos os extratos de plantas e óleos essenciais testados limitaram o crescimento micelial do patógeno. Os extratos aquosos de mentrasto e citronela na dose de 10.000 ppm inibiram o crescimento do patógeno em mais de 50%. Os quatro óleos essenciais inibiram o crescimento do patógeno entre 77 e 100%, na dose de 1.200 ppm. Em relação a inibição de germinação de escleródios, apenas os óleos essenciais apresentaram efeito inibitório na dose de 1.200 ppm com média de 5% de escleródios germinados. Os agentes de biocontrole (*Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.), os extratos de plantas e óleos essenciais apresentam potencial para o controle de *S. cepivorum*.

ABSTRACT

FUGA, Cícero Augusto Guimarães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013.
Prospection of microorganisms and botanical substances for the control of *Sclerotium cepivorum*. Adviser: Everaldo Antônio Lopes. Co-advisers: Marcelo Rodrigues dos Reis e Luiz Antônio Maffia.

White rot, caused by the fungus *Sclerotium cepivorum*, is one of the most important diseases of garlic and onion throughout the world. In the quest for sustainable alternatives for the management of the disease, biocontrol agents and substances found in the extracts and essential oils of plants can be potentially useful on the inhibition of the growth of the pathogen. Thus, the objective of this work was to evaluate the antagonism of isolates of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. and the fungitoxicity of botanical extracts and oils to *S. cepivorum* 'in vitro'. In the chapter I, it was assessed the antagonism of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. to *S. cepivorum* by means of the direct confrontation technique and by the production of toxic metabolites in Petri dishes. After the screening of the most efficient isolates, it was assessed the compatibility among them. In the chapter II, it was evaluated the fungitoxicity of aqueous and ethanolic extracts of plants (rue, mentrasto, citronella, garlic, ginger and saffron), and of essential oils (citronella, rosemary, neem and eucalyptus) on the mycelial growth and sclerotia germination of *S. cepivorum* in Petri dishes. Seven isolates of *Bacillus* spp. and five isolates of *Trichoderma* spp. were selected as a result of their antagonistic effect to *S. cepivorum*. All antagonists acted by antibiosis, with different levels of toxicity to the pathogen. Some isolates were not compatible. All plant extracts and essential oils reduced the mycelial growth of the pathogen. At 10.000 ppm, aqueous extracts of mentrasto and citronella reduced the growth of the colony by more than 50%. All essential oils inhibited the growth of the pathogen from 77 to 100% at 1.200 ppm. The germination of sclerotia was reduced only by the essential oils at 1.200 ppm, with the average of 5% of germinated sclerotia. Biocontrol agents (*Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp.), plant extracts and essential oils have potential to the control of *S. cepivorum*.

INTRODUÇÃO GERAL

O alho (*Allium sativum* L.) e a cebola (*Allium cepa* L.) estão entre as principais hortaliças cultivadas no Brasil. O estado de Minas Gerais é um dos principais estados produtores destas aliáceas, com destaque para a região do Alto Paranaíba, onde estão os municípios de São Gotardo e Rio Paranaíba, os líderes em produção (IBGE, 2012).

Tais culturas demandam elevados custos de produção, em parte devido ao emprego crescente de defensivos agrícolas para o controle dos principais problemas fitossanitários.

Dentre os fatores bióticos que afetam a produção sustentável do alho e da cebola, destaca-se a podridão-branca, doença causada pelo fungo de solo *Sclerotium cepivorum* (Nunes; Kimati, 2004). A agressividade e a capacidade do patógeno em sobreviver por longos períodos no solo, em função da formação de escleródios, fazem com que esta doença seja de difícil controle (Maude, 2006; Valle; Aguilar, 2004). O sintoma mais facilmente reconhecível da podridão branca, bem como de muitos outros agentes patogênicos que infectam o sistema radicular, é o amarelecimento e ‘dieback’ das folhas, seguido de morte das folhas afetadas. Devido à morte das raízes, as plantas infectadas são facilmente arrancadas do solo. O bulbo apresenta podridão-mole nos tecidos e crescimento micelial esbranquiçado na base da planta, progredindo para a produção de massas de pequenos escleródios pretos, dando aspecto enegrecido aos bulbos (Nunes; Kimati, 2004).

A doença é disseminada quando escleródios ou material infectado são transportados durante o cultivo, o que pode ocorrer por meio de implementos agrícolas e sapatos contendo solo infestado aderido, enxurrada ou água de irrigação capaz de carrear solo. A disseminação da doença pode ainda ocorrer de planta para planta em culturas mais adensadas, resultado do contato entre os bulbos ou raízes. O foco inicial no primeiro ano de cultivo pode ser pequeno; porém, aumenta rapidamente na lavoura pelo movimento de máquinas e implementos e com o uso de irrigação (Entwistle, 1990).

Devido a sua fácil disseminação e negligência dos produtores, a podridão branca já é relatada na maioria dos campos de produção de alho e cebola na região do Alto Paranaíba. As perdas causadas em lavouras de alho e cebola em decorrência da doença podem chegar a 100% (Pinto *et al.*, 1998), tornando impraticável o cultivo de aliáceas em áreas infestadas.

A busca por agentes de biocontrole e substâncias vegetais ativas contra *S. cepivorum* é uma importante abordagem de pesquisa visando ao controle da doença,

aliando uso de métodos ambientalmente mais seguros e possibilidade de inovação tecnológica para a agricultura.

Fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus* possuem diferentes mecanismos de ação contra patógenos, como, por exemplo, *Rizhooctonia solani* (Asaka; Shoda, 1996; Melo; Faull, 2000), *Fusarium* spp. (Srivastava *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2011) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Abdullahet *al.*, 2008). Além disso, podem ser encontrados em uma vasta diversidade de ambientes, são fáceis de serem cultivados, possuem rápido crescimento em grande número de substratos e não são patogênicos para plantas superiores. São capazes de inibir fitopatógenos por meio de competição, produção de metabólitos secundários e, no caso de *Trichoderma*, podem parasitar estruturas de resistência de patógenos, a exemplo dos escleródios, esporos e clamidósporos. Além disso, alguns isolados do fungo e da bactéria podem promover o crescimento de plantas (Harman *et al.*, 2004; Ortiz-Castro *et al.*, 2008; Leelasuphakul *et al.*, 2008).

Além dos microrganismos, extratos vegetais e óleos essenciais podem conter substâncias ativas contra inúmeros fitopatógenos (Antunes; Cavacob, 2010). Extratos vegetais (EV) são soluções concentradas, obtidas através de partes vegetativas das plantas. Os materiais vegetais podem passar ou não por tratamento prévio, seja secagem ou moagem, antes da adição dos solventes ou extratores (água, etanol, hexano, entre outros) (Negi, 2012). Por sua vez, óleos essenciais (OE) são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de materiais vegetais por destilação (Negi, 2012). Os EV e OE podem ter em sua constituição cem ou mais compostos orgânicos, embora a maior frequência seja de terpenos, terpenóides e compostos aromáticos (Bakkali *et al.*, 2008). O principal sítio de ação das substâncias vegetais presentes nos extratos ou óleos essenciais são as membranas celulares (Turina *et al.*, 2006; Di Pasqua *et al.*, 2007).

Considerando que a escassez de informações é notória no Brasil em relação ao controle de *S. cepivorum* e dada a importância da podridão branca para as culturas do alho e da cebola, o presente trabalho teve como objetivos:

- a) Selecionar isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. antagônicos a *S. cepivorum*;
- b) Verificar a produção de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. e sua influência no crescimento micelial de *S. cepivorum*;
- c) Avaliar a compatibilidade entre os isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp.;

d) Avaliar o efeito fungitóxico de extratos vegetais e óleos essenciais sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de *S. cepivorum*.

LITERATURA CITADA

ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v.10, p.1354-1359, 2008.

ANTUNES, M.D.C.; CAVACOB, A. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**, v.25, p.351-366, 2010.

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.4081-4085, 1996.

CAO, Y.; ZHANG, Z.; LING, N.; YUAN, Y.; ZHENG, X.; SHEN, B.; SHEN, Q. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. **Biology and Fertility of Soils**, v.47, p.495-506, 2011.

DI PASQUA, R.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.4863-4870, 2007.

ENTWISTLE, A.R. Root diseases, in Onions and Allied Crops. In: RABINOWITCH, H.D.; BREWSTER, J.L. (Ed.). **Agronomy, Biotic Interactions, Pathology, and Crop Protection**. Florida: CRC Press, 1990. p.103-154.

ESLER, G.; COLEY-SMITH, J.R. Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. **Plant Pathology**, v.32, p.13-22, 1983.

HARMAN, G.E.; HOWEL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEEA, P.; CHUENCHITTB, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **PostharvestBiology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

MAUDE, R.B. Onion Diseases. In: COOKE, B.M.; JONES, D.G.; KAYE, B. (Ed.). **The Epidemiology of Plant Diseases**. 2 ed. Dordrecht: Springer, 2006. p.506-509.

MELO, I.S.; FAULL, J.L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agrícola**, v.57, p.55-59, 2000.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v.156, p.07-17, 2012.

NUNES, M.E.T.; KIMATI, H. Doenças do alho e cebola. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. Piracicaba: Ceres, 2004. p.49-64.

ORTÍZ-CASTRO, R.; VALENCIA-CANTERO, E.; LÓPEZ-BUCIO, J. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. **Plant Signal Behavior**, v.3, p.263–265, 2008.

PINTO, C.M.F.; MAFFIA, L.A.; BERGER, R.D.; MIZUBUTI, E.S.G.; CASALI, V.W.D. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. **Plant Disease**, v.82, p.1142-1146, 1998.

SRIVASTAVA, R.; KHALID, A.; SINGH, U.S.; SHARMA, A.K. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. **Biological Control**, v.53, p.24-31, 2010.

TURINA, A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v.122, p.101–113, 2006.

VALLE, R.V.; AGUILAR, M.M.M. Persistencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. em suelos infestados de Aguascalientes y Zacatecas, Mexico. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v.22, p.143-146, 2004.

CAPÍTULO I

ANTAGONISMO DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma* spp. A *Sclerotium cepivorum*

RESUMO: O controle biológico pode ser uma alternativa viável para o manejo da podridão branca do alho, causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum*, principalmente se envolver a mistura de antagonistas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antagônico de espécies de *Trichoderma* e *Bacillus* no controle de *S. cepivorum* e verificar a compatibilidade entre os isolados eficientes, visando futura aplicação conjunta dos microrganismos. Foi avaliado o antagonismo de 46 isolados de *Bacillus* spp. e nove isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo fitopatogênico por meio da técnica de cultivo pareado em placas de Petri. Após a seleção dos isolados mais eficientes, avaliou-se a produção e termoestabilidade de metabólitos por *Bacillus* e a produção e influência de metabólitos de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial de *S. cepivorum*. Por fim, a compatibilidade entre os isolados mais promissores foi avaliada em placas de Petri. Oito isolados de *Bacillus* e cinco isolados de *Trichoderma* apresentaram efeito antagônico a *S. cepivorum* nos experimentos de cultivo pareado, com formação de halo de inibição pelas bactérias e colonização do patógeno pelos isolados de *Trichoderma*. Os metabólitos termoestáveis de *Bacillus* inibiram o crescimento micelial de *S. cepivorum*. Os filtrados de *Trichoderma* não apresentaram efeito no crescimento micelial do patógeno, mas retardaram a formação de escleródios. A maioria dos isolados selecionados foi compatível entre si. Os isolados de *Bacillus* B01, B03, B10, B120, B570, B571, B854 e B934 e os isolados de *Trichoderma* SF32, SF45, SF206, SF301 e SF311 foram antagônicos à *S. cepivorum* e podem ser úteis para o manejo integrado do patógeno.

Palavras-chave: *Allium cepa*, *Allium sativum*, Controle biológico, Podridão branca.

ANTAGONISM OF *Bacillus* spp. AND *Trichoderma* spp. TO *Sclerotium cepivorum*

ABSTRACT: Biological control can be a viable alternative for the management of garlic white rot, caused by the fungus *Sclerotium cepivorum*, mainly when involving a mixture of antagonists. Thus, the objective of this work was to evaluate the antagonistic potential of species of *Trichoderma* and *Bacillus* on the control of *S. cepivorum* and to verify the compatibility among the most efficient isolates, aiming the combined application of them in the future. It was evaluated the antagonism of 46 isolates of *Bacillus* spp. and nine isolates of *Trichoderma* spp. to the plant-pathogenic fungus by the method of paired culture in Petri dishes. After the selection of the most efficient isolates, it was evaluated the production and thermostability of *Bacillus* metabolites and the metabolites of *Trichoderma* on the mycelia growth of *S. cepivorum*. Finally, the compatibility among the most promising isolates was assessed in Petri dishes. Eight isolates of *Bacillus* and five strains of *Trichoderma* showed antagonistic effect to *S. cepivorum* in paired cultures, with the formation of inhibition halos by the bacterium and colonization of the pathogen by isolates of *Trichoderma*. The thermostable metabolites produced by *Bacillus* inhibited the mycelia growth of *S. cepivorum*. The filtrates of *Trichoderma* had no effect on the mycelial growth of the pathogen, but slowed the formation of sclerotia. The majority of the isolates selected in this study were compatible among them. The isolates of *Bacillus* B01, B03, B10, B120, B570, B571, B854 and B934 and the isolates of *Trichoderma* SF32, SF45, SF206, SF301 and SF311 were antagonistic to *S. cepivorum* and can be useful for the integrated management of the pathogen.

Key words: *Allium cepa*, *Allium sativum*, Biological control, White rot.

INTRODUÇÃO

O cultivo do alho (*Allium sativum* L.) e da cebola (*Allium cepa* L.) são bastante afetados pela ocorrência de doenças fúngicas foliares e radiculares. Dentre as doenças fúngicas importantes das aliáceas, merecem destaque aquelas causadas por patógenos radiculares, que provocam perdas através de tombamento de plântulas, podridões de bulbos e raízes e murchas vasculares, estando entre os principais fatores que reduzem drasticamente a produtividade das culturas (Agrios, 2005). *Sclerotium cepivorum*, agente causal da podridão branca, tem-se apresentado como o principal patógeno radicular das espécies de *Allium* sp. e vem ocasionado severas perdas no Brasil (Pinto *et al.*, 2000) e em outros países (Andrea *et al.*, 1996; Earnshaw *et al.*, 2000), sem apresentar medidas de controle eficientes. As medidas de controle químico, além de apresentarem baixa eficiência, estão sujeitas a contaminação do solo devido a altas doses usadas. Estudos confirmam que o sucesso do controle da podridão branca com uso de fungicidas pode variar muito entre os anos (Tyson *et al.*, 1999; Zewide *et al.*, 2007). O desempenho variável e imprevisível dos fungicidas introduz um novo elemento de risco em campos de produção de alho e cebola, principalmente em áreas densamente infestadas por *S. cepivorum*.

A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com pesticidas vem alterando o cenário agrícola, demandando novas tecnologias, dentre as quais se insere a agricultura sustentável. A transição da agricultura convencional para uma agricultura sustentável é um grande desafio, no qual a proteção de plantas está inserida. Nesse sentido, na resolução dos problemas relacionados com a ocorrência de pragas e doenças de plantas em níveis de danos econômicos devem ser utilizadas técnicas que propiciem a mínima dependência externa de insumos, o aumento da biodiversidade, a manutenção da estrutura do solo, o baixo ou nenhum risco ambiental e toxicológico e uma boa produtividade agrícola (Morandi; Bettiol, 2009).

O biocontrole de doenças radiculares é a área mais desenvolvida de biocontrole de doenças de plantas. A introdução de microrganismos adaptados ao microhabitat do patógeno é um dos aspectos mais relevantes para o sucesso de um programa de controle biológico de doenças de plantas. Neste contexto, diversos microrganismos são isolados, selecionados e utilizados como agentes biocontroladores de doenças. Muitos fungos e bactérias têm sido testados no controle de doenças radiculares, alguns com sucesso comprovado, e muitos outros com grande potencial de uso. Dentre os microrganismos

estudados, os fungos e as bactérias do gênero *Trichoderma* e *Bacillus*, respectivamente, estão entre os mais estudados por apresentarem mais de um mecanismo de biocontrole, podem ser capazes de inibir uma variada gama de patógenos e ainda são conhecidos por promoverem crescimento de plantas (Michereff; Barros, 2001).

A literatura mundial está repleta de trabalhos explorando o controle biológico de fungos fitopatogênicos que causam doenças radiculares. Entretanto, no Brasil há poucos relatos de microrganismos eficientes no controle de *S. cepivorum*, e ainda, a grande maioria das abordagens aplicadas ao controle biológico de doenças de plantas tem sido baseada no uso de um único antagonista contra o patógeno alvo (Moreno *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2011). Desta forma, a introdução de uma mistura de antagonistas provavelmente lograria em maior sucesso, aumentando a eficácia e confiabilidade do controle, em função da ampliação do espectro de atividade, podendo reunir vários mecanismos de ação contra o patógeno alvo (Nandakumar *et al.*, 2001; Thilgavathi *et al.*, 2007). Algumas vantagens da combinação de antagonistas no controle biológico podem ser listadas (Lemanceau; Alabouvette, 1991; Meyer; Roberts, 2002): a) múltiplos modos de ação contra o patógeno alvo; b) habilidade para afetar mais do que um estágio do ciclo de vida do patógeno alvo; c) atividade durante diferentes épocas na estação de crescimento; d) aumentar a consistência na performance em ampla gama de condições de solo; e) potencial para selecionar organismos que afetem mais do que um patógeno ou pragas, aumentando o espectro de uso do produto. Diante desta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivos, avaliar o potencial antagônico de espécies de *Trichoderma* e *Bacillus* para o controle do agente causal da podridão branca (*S. cepivorum*), e verificar a compatibilidade entre os isolados eficientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais de realização dos experimentos

Os experimentos relacionados ao isolamento e seleção dos antagonistas foram realizados no Laboratório de Bioquímica, Fitopatologia e Genética Molecular da Universidade Federal de Viçosa, *Campus* de Rio Paranaíba (UFV-CRP) e no Laboratório de Melhoramento Vegetal e Genética do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Obtenção do fitopatígeno

O isolado de *S. cepivorum* utilizado neste estudo foi obtido de escleródios formados na superfície de bulbos de alhos infectados, provenientes de campos comerciais de Rio Paranaíba-MG. Em laboratório, os escleródios foram previamente desinfestados em álcool a 50% e hipoclorito de sódio a 0,5%, por 30 e 60 segundos, respectivamente. Em seguida, os escleródios foram enxaguados em água destilada estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas de Petri foram mantidas a 20 °C. Assim que os escleródios começaram a germinar, retirou-se um disco de micélio da borda da colônia e transferiu-se para placa de Petri, incubando-o novamente nas mesmas condições descritas acima.

Isolamento das bactérias a partir do solo

A coleta de solo para isolamento de *Bacillus* foi realizada em diferentes locais de mata nativa nas cidades de Rio Paranaíba, Patos de Minas, São Gotardo, Carmo do Paranaíba e Patrocínio localizadas na região do Alto Paranaíba - MG. O isolamento das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* seguiu a metodologia descrita pela World Health Organization (1985). Para tanto, um grama de solo foi diluída em 10 mL de solução salina estéril (0,01 mM $\text{CaCO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,08 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,006 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,07 mM $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,006 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,0) e homogeneizada no vórtex por um minuto. Após, retirou-se uma alíquota de 1 mL para o processo de pasteurização (12 minutos a 80 °C em banho maria e posterior choque térmico em gelo triturado por 5 minutos), visando à seleção das bactérias esporulantes.

Após esse período, a suspensão foi diluída duas vezes, atingindo uma proporção de 10^{-2} . Da última diluição, foram aplicados 100 μL em placa de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB), seguido de incubação em estufa BOD a 28 °C durante 24 horas. Os isolados obtidos foram mantidos a 4° C, em geladeira, preservados através da técnica de conservação em óleo mineral (Alfenas; Mafia, 2007).

Antagonismo de *Bacillus* spp. a *Sclerotium cepivorum*

Foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placa de Petri contendo BDA, conforme descrito por Dennis e Webster (1971). Para isso, escleródios de *S. cepivorum* foram transferidos, com o auxílio de pinça, para placas de Petri contendo BDA e posicionados a 1 cm da borda da placa. As placas foram mantidas em BOD a 20°C. Após três dias, o isolado bacteriano foi semeado com alça de platina no lado oposto da placa, seguida de incubação em BOD a 20°C. A testemunha continha apenas o

fitopatígeno. Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. Avaliou-se o antagonismo dos isolados bacterianos aos 15 dias após a semeadura nas placas, com medições do crescimento micelial do fitopatígeno no sentido ortogonal do isolado bacteriano e observação da formação de halos de inibição. Quando ocorreu halo de inibição, o micélio do fungo limítrofe ao halo de inibição foi repicado para placas de Petri contendo BDA, para verificar se o efeito dos metabólitos bacterianos foi fungicida ou fungistático.

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental. O experimento foi repetido duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Levene para testar a normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Realizou-se análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade) e os tratamentos comparados por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com o uso do pacote estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft, 2004).

Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp.

Para testar a produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos pelos isolados de *Bacillus* spp. que demonstraram eficiência no experimento de cultura pareada, colônias das bactérias foram transferidas para erlenmeyers contendo meio líquido à base de batata-dextrose (BD) e mantidos em condições ambiente de laboratório por sete dias, sob agitação a 150 rpm em agitador mecânico, no escuro. Após este período, alíquotas de cada caldo fermentado foram transferidos para erlenmeyers contendo meio BD obtendo-se concentrações de 20, 50 e 80% (caldo fermentado/BD). Afim de se obter concentrações nutricionais (batata e dextrose) iguais em todos os tratamentos, o meio BD adicionado ao caldo fermentado continha 250, 400 e 1000 g.L⁻¹ de batata e 25, 40 e 100 g.L⁻¹ de dextrose nas concentrações de 20, 50 e 80%, respectivamente. Posteriormente foi adicionado ágar na concentração de 20 g.L⁻¹ e esterilizados em autoclave por 20 min, a 120 °C. Após homogeneização da suspensão, foi vertido 20 mL em placas de Petri. Após a solidificação do meio, semeou-se no centro de cada placa um disco de 5 mm de diâmetro de colônias do fitopatígeno. A testemunha continha apenas o fitopatígeno no meio de cultura BDA, sem a presença de metabólitos. Aos 7 e 21 dias de incubação em BOD a 20 °C, foi avaliado o crescimento micelial do fitopatígeno através da medição do diâmetro da colônia no sentido ortogonal.

O experimento foi montado em esquema fatorial 7x3+1, sendo sete isolados bacterianos, três concentrações e um tratamento adicional (testemunha), em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental. O experimento foi repetido duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Levene para testar a normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Realizou-se a análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade), e os tratamentos foram comparados entre si por meio do teste de Tukey e comparados com a testemunha através do teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade com o uso do pacote estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft, 2004).

Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Sclerotium cepivorum*

Foram estudados nove isolados de *Trichoderma* spp. (SF04, SF32, SF44, SF45, SF157, SF206, SF301, SF309 e SF311) pertencentes ao Laboratório de Biocontrole Farroupilha (Grupo Farroupilha, Patos de Minas – MG). O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra *S. cepivorum* foi avaliado pelo método de culturas pareadas, conforme descrito por Mello *et al.* (2007). Para tal, discos de ágar de 5 mm de diâmetro contendo micélio de *S. cepivorum* e do antagonista foram retirados de colônias com 10 dias de cultivo e depositados, simultaneamente, em extremidades opostas das placas de Petri (a 1 cm da borda da placa), contendo meio batata dextrose ágar (BDA). A testemunha continha apenas o antagonista. As placas foram mantidas em BOD a 20 °C por 15 dias, quando o crescimento micelial dos fungos foi avaliado conforme escala proposta por Bell *et al.* (1982) e pela medição do crescimento micelial do isolado de *Trichoderma*.

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, considerando-se cada placa como unidade experimental. O experimento foi repetido duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Levene para testar a normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Realizou-se análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade) e os tratamentos comparados por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com o uso do pacote estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft, 2004).

Produção e influência de metabólitos de *Trichoderma* no crescimento micelial de *S. cepivorum*

Para se avaliar o efeito inibitório de metabólitos produzidos pelos isolados de *Trichoderma* foi selecionado apenas aqueles que apresentaram eficiência no experimento de cultivo pareado, utilizando-se como base a metodologia descrita por Agrawal *et al.* (1977), com modificações. Os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em erlenmeyers de 1.000 mL contendo 400 mL de meio líquido à base de BD. Utilizaram-se cinco discos de micélio por erlenmeyer, retirados de colônias de *Trichoderma* desenvolvidas em BDA, com sete dias de idade. Os frascos foram mantidos em condições ambiente de laboratório por sete dias, sob agitação a 150 rpm em agitador mecânico, no escuro. Após sete dias a parte líquida foi coletada por filtração em papel filtro e novamente filtrados em membrana de nitrocelulose (Millipore®) de 0,2 µm. O meio BD com a presença de metabólitos foi então incorporado ao meio BDA autoclavado ainda fundente, na concentração de 25% (v:v). Após a solidificação do meio, semeou-se no centro de cada placa um disco de 5 mm de diâmetro de colônias do fitopatógeno. A testemunha continha apenas o fitopatógeno no meio de cultura BDA, sem a presença de metabólitos. Aos sete dias de incubação em BOD a 20 °C, foi avaliado o crescimento micelial do fitopatógeno através da medição do diâmetro da colônia no sentido ortogonal.

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, considerando-se cada placa como unidade experimental. O experimento foi repetido duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Levene para testar a normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Realizou-se análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade) e os tratamentos comparados por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com o uso do pacote estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft, 2004).

Compatibilidade entre isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.

A compatibilidade entre isolados de *Bacillus* e *Trichoderma* foi testada apenas entre os isolados que demonstraram eficiência nos experimentos de antagonismo a *S. cepivorum*.

Para se estudar o antagonismo dos isolados de *Bacillus* em relação aos isolados de *Trichoderma* adotou-se teste de antagonismo em confrontação direta como descrito anteriormente, seguindo metodologia proposta por Dennis e Webster (1971).

Para a análise da ação antagonista dos metabólitos produzidos pelos isolados de *Trichoderma* em relação aos isolados de *Bacillus* foi utilizado o procedimento de difusão em meio sólido desenvolvido por Bauer *et al.* (1966). Em placas de Petri estéreis, foi inoculado 1 mL da suspensão de cada bactéria, e em seguida foram adicionados 20 mL de Luria Bertani Ágar (LBA) fundido a 45 °C. Logo após a solidificação do meio de cultura, foram depositados discos de papel de filtro de 1 cm de diâmetro embebidos com metabólitos dos isolados de *Trichoderma* e incubou-se a 28 °C por 48 horas. Os metabólitos de *Trichoderma* utilizados foram obtidos conforme descrito anteriormente.

Foi considerado como possuidor de atividade antagonista aquele isolado (*Bacillus*) ou produto (metabólito de *Trichoderma*) que apresentou a formação de halo de inibição. Os experimentos foram montados em esquema fatorial 7x6, sendo sete isolados bacterianos e cinco isolados fúngicos ou testemunha (disco de papel filtro embebido em água estéril), em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental. O experimento foi repetido duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos à análise descritiva, por se tratar de uma variável qualitativa nominal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antagonismo de *Bacillus* spp. a *Sclerotium cepivorum*

A maioria dos isolados (n = 37) não inibiu o crescimento do patógeno (Tabela 1). Por sua vez, oito isolados bacterianos (B01, B03, B10, B120, B570, B571, B854 e B934) reduziram o crescimento micelial do fungo entre 42,2 e 50,2%, em decorrência da presença de halo de inibição pronunciado. O isolado B113 também reduziu o crescimento micelial do fungo; entretanto, seu efeito foi menos pronunciado e não formou halo de inibição. Este resultado demonstra que a inibição do crescimento micelial foi devida a antibiose, sugerindo a produção de metabólitos secundários extracelulares pelos isolados bacterianos com ação antifúngica, que podem ser antibióticos, quitinases, glucanases e outros tipos de polipeptídeos (Kudan; Pichyangkura, 2009; Amin *et al.*, 2012). Embora durante o pareamento não tenha ocorrido sobreposição da colônia bacteriana sobre o fitopatógeno, observou-se escurecimento do micélio de *S. cepivorum*, na região de influência dos possíveis metabólitos produzidos pelas bactérias. Em microscópio óptico foi observado encurtamento das células e forte engrossamento das paredes das hifas do patógeno. Tal

observação também é citada por Kupper *et al.* (2003), que também relataram um escurecimento do micélio de *Colletotrichum acutatum* sob influência de isolados de *Bacillus subtilis*, apresentando as mesmas modificações celulares. Estas modificações celulares observadas, provavelmente estão relacionadas com algum mecanismo de defesa do patógeno. Este efeito observado no micélio do patógeno foi fungistático, pois o fungo voltou a crescer quando repicado para placas de Petri com BDA.

Tabela 1. Efeito antagônico ‘in vitro’ de isolados bacterianos sobre o crescimento micelial (diâmetro da colônia) de *Sclerotium cepivorum*.

Isolado	Crescimento micelial (cm)		Isolado	Crescimento micelial (cm)	
B854	3,46	a ⁽¹⁾	B137	7,65	c
B934	3,49	a	B627	7,66	c
B10	3,62	a	B118	7,66	c
B571	3,63	a	B92	7,69	c
B570	3,72	a	B16	7,76	c
B120	3,78	a	B119	8,00	c
B03	3,87	a	B121	8,00	c
B01	4,03	a	B117	8,00	c
B113	6,29	b	B145	8,00	c
B02	6,87	bc	B61	8,00	c
B679	6,95	bc	B94	8,00	c
B678	7,01	bc	B592	8,00	c
B680	7,12	bc	B114	8,00	c
B62	7,16	bc	B15	8,00	c
B188	7,16	bc	B14	8,00	c
B07	7,27	bc	B12	8,00	c
B78	7,38	bc	B681	8,00	c
B580	7,48	bc	B11	8,00	c
B957	7,50	bc	B855	8,00	c
B116	7,50	c	B08	8,00	c
B996	7,60	c	B06	8,00	c
B110	7,60	c	B115	8,00	c
B95	7,63	c	Testemunha	8,00	c
B965	7,64	c			

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Trabalhos realizados em outros países também demonstraram o potencial de bactérias no controle de *S. cepivorum*. Na Romênia, Dinu *et al.* (2012) relataram inibição in vitro de crescimento micelial do patógeno acima de 70% ocasionada por espécies de *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus*. No Canadá, Utkhede & Rahe (1983) demonstraram in vitro a capacidade de onze isolados de *Bacillus* em inibir

o crescimento micelial de treze isolados de *S. cepivorum* obtidos de diferentes países, através da formação de zonas de inibição.

Apesar dos bons resultados de antagonismo obtidos neste trabalho, nem sempre são garantias de eficiência em programas de manejo, muitas vezes, a eficácia dos antagonistas in vitro, podem ser insuficientes perante uma série de fatores, uma vez que as condições em laboratório são controladas de forma que o isolado apresente máximo desempenho. Por isso, conduzir estudos em campo é de grande importância para se conhecer os efeitos edafoclimáticos sobre as bactérias antagonistas.

Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Sclerotium cepivorum*

Dentre os isolados de *Trichoderma* testados, SF45, SF32, SF301, SF311 e SF206 foram os que apresentaram maior atividade antagonista aos 15 dias de cultivo pareado, reduzindo o crescimento do patógeno a 0 cm, significativamente inferior aos demais isolados (Tabela 2). De acordo com a classificação de Bell *et al.* (1982), os cinco isolados apresentaram nota 1, ocupando 100% da superfície do meio e colonizando o patógeno, sendo classificado como altamente antagônico a *S. cepivorum*, aos 15 dias de cultivo em placa de Petri. Por outro lado, os isolados SF309, SF04, SF44 e SF157 apresentaram notas que variaram entre 2,6 e 3, apresentando pequeno ou nenhum antagonismo (Bell *et al.*, 1982), respectivamente. Os isolados de *Trichoderma* considerados eficientes neste trabalho possivelmente apresentaram efeito antagônico devido a uma ou mais formas de ação sobre o fitopatógeno, que podem ser tanto pela produção de metabólitos (Thrane *et al.*, 2000), como também pelo hiperparasitismo (Papavizas, 1985; Harman, 2000) e pela competição por nutrientes e espaço. As espécies de *Trichoderma* podem produzir exoglucanases e endoglucanases, celobiase e quitinase, que são enzimas importantes na degradação e na lise da parede celular de fungos fitopatogênicos (Papavizas, 1985). Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente durante o processo de vida do antagonista. A capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie.

Resultados similares foram obtidos por Castillo *et al.* (2011) em que as espécies de *Trichoderma longibrachiatum* e *T. asperellum* demonstraram efeito altamente antagônico pela escala de Bell *et al.* (1982) contra *S. cepivorum* in vitro. Este feito também foi relatado por Ávila *et al.* (2005) e Mello *et al.* (2007) avaliando efeito antagônico de isolados de *Trichoderma* em relação a *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, patógenos que também produzem escleródios.

Tabela 2. Crescimento micelial de *S. cepivorum* em cultura pareada com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. mantidos por 15 dias em BOD.

Isolado	Crescimento micelial do fitopatógeno (cm)	Nota ⁽¹⁾	% de crescimento do <i>Trichoderma</i> ⁽²⁾
SF 45	0,00 a ⁽³⁾	1	100
SF 32	0,00 a	1	100
SF 301	0,00 a	1	100
SF 311	0,00 a	1	100
SF 206	0,00 a	1	100
SF 309	2,93 b	2,6	56,4
SF 157	4,28 c	3	50
SF 04	4,29 c	3	50
SF 44	4,66 c	3	50
Testemunha	9,00 d	5	0

⁽¹⁾ Notas de acordo com a escala proposta por Bell *et al.* (1982). ⁽²⁾ Área da placa coberta pelo isolado de *Trichoderma* em porcentagem. ⁽³⁾ Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

É importante que isolados de *Trichoderma* testados in vitro apresentem efeito antagônico bastante pronunciado para serem testados posteriormente a campo, pois sua eficiência é reduzida devido aos efeitos edafoclimáticos. Trabalhos realizados em outros países demonstram o potencial de uso em campo de isolados de *Trichoderma* no manejo de *S. cepivorum*. No Reino Unido, a aplicação de dois isolados de *Trichoderma viride* e um isolado de *T. pseudokoningii* degradaram até 80% de escleródios de quatro isolados de *S. cepivorum* em um solo argiloso (Clarkson *et al.*, 2004). No México, a cepa C4 de *T. harzianum* aplicado através de farelo de trigo colonizado em uma dose de 25 g m⁻¹ no sulco antes do plantio atrasou o aparecimento da doença por 40 dias em relação ao tratamento controle, fornecendo proteção temporária contra a podridão branca do alho (Avila-Miranda *et al.*, 2006).

Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp.

Houve interação significativa entre as doses testadas e os isolados bacterianos. Aos sete dias de avaliação todos os isolados de *Bacillus* spp. diferiram estatisticamente da testemunha pelo teste de Dunnett, o que revela que os metabólitos produzidos mostraram-se termoestáveis e mantiveram suas atividades mesmo após a autoclavagem (Tabela 3). Três isolados (B03, B10 e B120) apresentaram efeito antifúngico acentuado aos sete dias, impedindo igualmente o crescimento micelial do patógeno nas três concentrações testadas. De forma geral, com exceção dos isolados B01, B854 e B934 na concentração de 20%, todos os demais tratamentos apresentaram diâmetro da colônia

do patógeno inferior a 1,5 cm, inibindo o crescimento micelial de *S. cepivorum* em mais de 80% em relação à testemunha.

Através da análise estatística, aos 21 dias de avaliação, nota-se que as concentrações de 20 e 50% já não apresentam efeito antifúngico para a maioria dos isolados comparando-se com a testemunha. Entretanto, na concentração de 80% todos os isolados demonstraram efeito antifúngico sobre o crescimento micelial do patógeno, com destaque para os isolados B571, B570, B120 e B03 que mantiveram o diâmetro da colônia abaixo de 1,9 cm, diferindo dos demais isolados. O isolado B03 apresentou os menores valores de diâmetro da colônia fúngica nas três concentrações avaliadas aos 21 dias. Além disso, B03 foi o único isolado que apresentou-se estatisticamente diferente da testemunha nas três concentrações testadas, sugerindo que os metabólitos produzidos pelo mesmo possui efeito antifúngico em relação a *S. cepivorum* mais pronunciado, e consequentemente mais eficiente.

Tabela 3. Crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* em placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações (%) de meio BD autoclavado contendo metabólitos termoestáveis produzidos por isolados de *Bacillus* spp. após sete ou vinte e um dias de cultivo.

Isolado	Diâmetro da colônia fúngica (cm)					
	7 dias.....			21 dias.....		
	20%	50%	80%	20%	50%	80%
B01	2,3 bA	1,0 bB	1,0 bB	9,0 aA*	8,5 aA*	3,0 abB
B03	1,0 dA	1,0 bA	1,0 bA	4,2 bA	2,5 cAB	1,0 bB
B10	1,0 dA	1,0 bA	1,0 bA	8,4 aA*	7,8 abAB*	5,5 aB
B120	1,2 dA	1,0 bA	1,0 bA	7,5 aA*	4,5 bcB	1,1 bC
B570	1,4 cdA	1,0 bB	1,0 bB	6,8 abA*	6,3 abA*	1,7 bB
B571	1,5 cA	1,0 bB	1,0 bB	7,5 abA*	7,0 abA*	1,9 bB
B854	2,0 bA	1,5 aB	1,0 bB	6,7 abA*	5,9 abcA*	4,3 abA
B934	3,0 aA	1,4 abB	1,4 aB	9,0 aA*	4,7 bcB	4,3 abB
Testemunha	9,0			9,0		

⁽¹⁾Médias seguidas por letras maiúsculas na linha e letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^(*) Médias seguidas por um asterisco não diferem significativamente da testemunha, a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Na literatura encontram-se pesquisas avaliando termoestabilidade de metabólitos produzidos por bactérias com resultados positivos sobre outros patógenos, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Soria *et al.* (2012) ao estudarem o efeito de *B. subtilis* *Burkholderia* sp. sobre *Fusarium circinatum*, verificaram que ao utilizar

meio de cultura BDA acrescido de 10% de meio BD autoclavado contendo metabólitos termoeestáveis inibiramem até 50% o crescimento micelial do fungo, após quatro dias de incubação. Utilizando metodologia analoga a Soria *et al.* (2012), Kupper *et al.* (2003) relataram a produção de metabólitos termoeestáveis de 67 isolados de *Bacillus* capazes de inibir o crescimento micelial de *C. acutatum*.

A produção rápida e eficiente de metabólitos termoeestáveis pelas bactérias, juntamente com atividade antimicrobiana, como observado no presente trabalho, tornamestes organismos atraentes para estudos de controle biológico. A constatação da produção de substâncias inibidoras ao *S. cepivorum*, produzidas pelos diversos isolados de *Bacillus* spp., é especialmente importante para o entendimento do mecanismo de ação de tal antagonismo, possibilitando, dessa forma, o controle da doença pelo uso das substâncias produzidas e, não apenas pela introdução massal dos agentes de biocontrole.

Produção e influência de metabólitos de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *S. cepivorum*

Aos sete dias de avaliação não foi observado efeito dos filtrados de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial de *S. cepivorum*. O crescimento do patógeno no meio BDA acrescido dos filtrados dos cinco isolados de *Trichoderma*, foi igual a testemunha (sem filtrado) colonizando toda a placa. Entretanto, aos sete dias apenas no tratamento testemunha houve formação de escleródios. Escleródios formaram-se nas placas acrescidas com os filtrados aos 15 dias, demonstrando que os filtrados retardaram a formação das estruturas de sobrevivência do patógeno. Estes resultados indicam que os isolados de *Trichoderma* atuam por antibiose, entretanto devido a baixa eficiência, reforça a ideia de que estes isolados podem exercer a capacidade antagonista principalmente por outros meios de inibição, por exemplo, o micoparasitismo.

A inibição do crescimento de diversos fitopatógenos pela produção de substâncias não voláteis foi amplamente estudada por Dennis e Webster (1971). Eles relataram que a habilidade de espécies de *Trichoderma* produzirem tais substâncias variou entre isolados e que a suscetibilidade dos fungos foi variável. De forma semelhante, Ávila *et al.* (2005) observaram que diferentes isolados de *T. harzianum* e *T. atroviride* reduziram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* através de produção de metabólitos não voláteis, entretanto, essa redução variou bastante de acordo com cada isolado testado. Os bons resultados encontrados por estes autores podem estar relacionados com a metodologia empregada, pois não houve a diluição dos filtrados em meio de cultura. Portanto, o método utilizado e a concentração testada

influência os resultados, dessa maneira, os isolados de *Trichoderma* testados neste trabalho podem apresentar melhores resultados de inibição de *S. cepivorum* utilizando outros métodos de avaliação.

Compatibilidade entre isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos no experimento que avaliou o efeito antagonista dos isolados bacterianos sobre os isolados fúngicos, indicando que as bactérias B01, B10 e B934 formaram halo de inibição, inibindo o crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* SF301, SF206 e SF934, respectivamente, demonstrando que os metabólitos produzidos por tais bactérias podem ser tóxicos a outros organismos de biocontrole. Contudo, o restante das combinações testadas se mostrou compatível, sendo observado a sobreposição da colônia dos isolados de *Trichoderma* sobre os isolados de *Bacillus*.

Tabela 4. Presença ou ausência da formação de halo de inibição ocasionado pelos metabólitos de diferentes isolados de *Bacillus* em relação ao crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma*.

<i>Trichoderma</i>	<i>Bacillus</i>							
	B01	B03	B10	B120	B570	B571	B854	B934
SF32	-(¹)	-	-	-	-	-	-	-
SF45	-	-	-	-	-	-	-	-
SF206	-	-	+	-	-	-	-	-
SF301	+	-	-	-	-	-	-	+
SF311	-	-	-	-	-	-	-	-

(¹) Sinal negativo indica compatibilidade entre isolados e sinal positivo indica incompatibilidade devido a formação de halo de inibição.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados do experimento que avaliou o efeito antagonista de metabólitos dos isolados fúngicos sobre os isolados bacterianos. Os isolados de *Trichoderma* SF32, SF45 e SF311 não apresentaram produção de metabólitos tóxicos aos isolados bacterianos, pois não se observou a formação de halo de inibição em torno do disco de papel depositado sobre o meio de cultura. Entretanto, o isolado SF301 produziu metabólitos tóxicos capazes de inibirem o crescimento de todos os isolados bacterianos, com exceção do isolado B854, resultado que pode estar relacionado com a produção de antibióticos de largo espectro de ação pelo fungo. Também foi observada a formação de halo de inibição pelo isolado SF206, sendo incompatível com os isolados B120 e B934. A testemunha não apresentou halo de

inibição, demonstrando que o papel filtro utilizado não causou nenhum efeito no experimento.

Tabela 5. Presença ou ausência da formação de halo de inibição ocasionado pelos metabólitos de diferentes isolados de *Trichoderma* em relação ao crescimento bacteriano dos isolados de *Bacillus*.

<i>Bacillus</i>	<i>Trichoderma</i>					Test.
	SF32	SF45	SF206	SF301	SF311	
B01	-(¹)	-	-	+	-	-
B03	-	-	-	+	-	-
B10	-	-	-	+	-	-
B120	-	-	+	+	-	-
B570	-	-	-	+	-	-
B571	-	-	-	+	-	-
B854	-	-	-	-	-	-
B934	-	-	+	+	-	-

(¹) Sinal negativo indica compatibilidade entre isolados e sinal positivo indica incompatibilidade devido a formação de halo de inibição.

Entre as 35 combinações possíveis entre os isolados bacterianos e fúngicos, 12 se mostraram incompatíveis devido ao efeito antagônico observado nos dois experimentos, não sendo recomendada a aplicação desses microorganismos em conjunto em trabalhos futuros. Geralmente espera-se que a aplicação conjunta de antagonistas aumente a eficiência de controle, como foi observado por Mishra *et al.* (2013). Estes autores demonstraram efeito sinérgico de formulações mistas de *Trichoderma* e *Pseudomonas* apresentando maior controle de *S. rolfsii*, *R. solani*, *F. oxysporum* f.sp. *ciceri*, *Macrophomina phaseolina* e *S. sclerotiorum* em várias culturas, comparado-se com a aplicação dos antagonistas separadamente. Entretanto, efeito contrário também pode ocorrer. Stockell *et al.* (2010) observaram incompatibilidade entre *Pseudomonas fluorescens* e *Pantoea vagans*, obtendo controle inferior de *Erwinia amylovora* em pereira, comparando-se com a aplicação separada dos organismos.

Novos estudos devem ser realizados em condições de casa de vegetação e de campo, considerando a aplicação em conjunto ou separadamente dos antagonistas, para comprovar o potencial como agentes de biocontrole de *S. cepivorum* e verificar se a aplicação conjunta dos organismos compatíveis possui efeito sinérgico.

CONCLUSÃO

Os isolados de *Bacillus* B01, B03, B10, B120, B570, B571, B854 e B934 e os isolados de *Trichoderma* SF32, SF45, SF206, SF301 e SF311 apresentaram-se antagônicos à *S. cepivorum*, demonstrando serem promissores para o manejo integrado da podridão branca.

LITERATURA CITADA

- AGRAWAL, S.C.; KHARE, M.N.; AGRAWAL, P.S. Biological control of *Sclerotiumrolfssi* causing collar rot of lentil. **Indian Phytopathology**, v.30, p.176-179, 1977.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. Elsevier Academic Press: New York, 2005.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. 382p.
- AMIN, A.; KHAN, M.A.; EHSANULLAH, M.; HAROON, U.; AZAM, S.M.F.; HAMEED, A. Production of peptide antibiotics by *Bacillus* sp: GU 057 indigenously isolated from saline soil. **Brazilian Journal Microbiology**, v.43, p.1340-1346, 2012.
- ANDREA, T.B.; EMMA, Z.M.; CARMEN, G.C.; RONALD, F.C. The use of arbuscular mycorrhizae to control onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) under field conditions. **Mycorrhizae**, v.6, p.253-257, 1996.
- AVILA, Z.R.; CARVALHO, S.S.; BRAÚNA, L.M.; GOMES, D.M.P.A.; MELLO, S.C.M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 30p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 117).
- AVILA-MIRANDA, M.E.; HERRERA-ESTRELL, A.; PEÑA CABRIALES, J.J. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1823-1830, 2006.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p.379-382, 1982.

CASTILLO, F.D.H.; PADILLA, A.M.B.; MORALES, G.G.; SILLER, M.C.; HERRERA, R.R.; GONZALES, C.N.A.; REYES, F.C. In vitro antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.6, p.410-417, 2011.

CLARKSON, J.P.; MEAD, A.; PAYNE, T.; WHIPPS, J.M. Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. **Plant Pathology**, v.53, p.353-362, 2004.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.359-363, 1971.

DINU, S.; SICUIA, O.A.; CONSTANTINESCU, F.; LĂZUREANU, C.; OANCEA, F. Efficacy of some bacterial bioproducts against *Sclerotium cepivorum*. **Horticulturae**, v.56, p.81-88, 2012.

EARNSHAW, D.; MCDONALD, M.R.; BOLAND, G.J. Interaction among isolates and mycelial compatibility groups of *Sclerotium cepivorum* and cultivars of onion (*Allium cepa*). **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, p.387-391, 2000.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.376-393, 2000.

KUDAN, S.; PICHYANGKURA, R. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* SK-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.157, p.23-35, 2009.

KUPPER, K.C., GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.251-257, 2003.

LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE, C. Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. **Crop Protection**, v.10, p.279-286, 1991.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v.11, p.3-9, 2007.

MEYER, S.L.F.; ROBERTS, D.P. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. **Journal of Nematology**, v.34, p.01-08, 2002.

MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, 2001. 368p.

MISHRA, D.S.; KUMAR, A.; PRAJAPATI, C.R.; SINGH, A.K.; SHARMA, S.D. Identification of compatible bacterial and fungal isolate and their effectiveness against plant disease. **Journal of Environmental Biology**, v.34, p.183-189, 2013.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W; MORANDI, M.A.B.(Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.07-14.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; SHEELA, J.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. **Biocontrol**, v.46, p.493–510, 2001.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.23-54, 1985.

PINTO, C.M.F.; MAFFIA, L.A.; CASALI, V.W.D.; BERGER, R.D.; CARDOSO, A.A. Production components and yield loss of garlic cultivars planted at different times in a field naturally infested with *Sclerotium cepivorum*. **International Journal Pest Management**, v.46, p.67-72, 2000.

SORIA, S.; ALONSO, R.; BETTUCCI, L. Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. **Chilean Journal Agricultural Research**, v.72, p.281-284, 2012.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows (computer program manual)**. Tulsa, OK: Statsoft Inc, 2004.

STOCKWELL, V.O.; JOHNSON, K.B.; SUGAR, D.; LOPER, J.E. Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. **Biological Control**, v.101, p.113-123, 2011.

THILGAVATHI, R.; SARAVANAKUMAR, D.; RAGUPATHY, N.; SAMIYAPPAN, R. Integration of biocontrol agents for the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) disease in greengram. **Phytopathologia Mediterranea**, v.46, p.157–167, 2007.

THRANE, C.; JENSEN, D.F.; TRONSMO, A. Substrate colonization, strain competition, enzyme production in vitro, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. isolates P1 and T3. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.215-225, 2000.

TYSON, J.L.; FULLERTON, R.A.; STEWART, A. Changes in the efficacy of fungicidal control of onion white rot. **New Zealand Plant Protection**, v.52, p.171-175, 1999.

UTKHEDE, R.S.; RAHE, J.E. Interactions of antagonists and pathogen in biological control of onion white rot. **Phytopathology**, v.73, p.890-893, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide**. Geneva: UNDP/World Bank/WHO Special programmer of research and training in tropical diseases, 1985. 24p.

ZEWIDE, T.; FININSA, C.; SAKHUJA, P.K. Management of white rot (*Sclerotium cepivorum*) of garlic using fungicides in Ethiopia. **Crop Protection**, v.26, p.856-866, 2007.

CAPÍTULO II

EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotium cepivorum*

RESUMO: A podridão branca, causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum*, é uma das principais doenças das culturas do alho e da cebola em todo o mundo. Na busca por alternativas sustentáveis de manejo de doença, substâncias presentes em extratos e óleos essenciais de plantas podem ser potencialmente úteis na inibição do crescimento do patógeno. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes extratos vegetais e óleos essenciais na redução do crescimento micelial e na germinação de escleródios de *S. cepivorum*. No primeiro experimento, extratos aquosos e etanólicos (20%, m:v) de *Ageratum conyzoides*, *Ruta graveolens*, *Zingiber officinale*, *Crocus sativus*, *Allium sativum* e *Cymbopogon winterianus* foram acrescentados ao meio de cultivo de *S. cepivorum* (BDA) nas concentrações de 1.000 ou 10.000 ppm. No segundo experimento, óleos essenciais de *C. winterianus*, *Rosmarinus officinalis*, *Azadirachta indica* e *Eucalyptus citriodora* foram adicionados ao BDA nas concentrações de 100, 200, 400, 800 ou 1.200 ppm. Todos os extratos vegetais reduziram o crescimento micelial do fungo, dependendo da interação entre concentração e extrator utilizado. Na dose de 10.000 ppm, os extratos aquosos reduziram o crescimento da colônia fúngica entre 28,0% e 53,5%, especialmente os de *A. conyzoides* e *C. winterianus*. Por sua vez, nenhum extrato inibiu a germinação de escleródios. No segundo experimento, o crescimento micelial do fungo foi inibido em função da interação entre o tipo e a concentração do óleo essencial. Na concentração de 1.200 ppm, os óleos de citronela e alecrim inibiram completamente o crescimento do fungo, enquanto que para os óleos de nim e eucalipto as inibições foram de 77 e 83%, respectivamente. A germinação dos escleródios apenas foi inibida na concentração de 1.200 ppm, independentemente do tipo do óleo, resultando em apenas 5% de escleródios germinados. Conclui-se que os extratos vegetais e os óleos essenciais avaliados possuem substâncias inibidoras ao crescimento de *S. cepivorum*.

Palavras-chave: *Allium* spp., Controle de doenças, podridão branca.

**PLANT EXTRACTS AND ESSENTIAL OILS ON THE INHIBITION OF
THE MYCELIAL GROWTH AND GERMINATION OF SCLEROTIA OF
*Sclerotium cepivorum***

ABSTRACT: White rot, caused by the fungus *Sclerotium cepivorum*, is one of the most important diseases of garlic and onion throughout the world. In the quest for sustainable alternatives for the management of the disease, substances found in the extracts and essential oils of plants can be potentially useful on the inhibition of the growth of the pathogen. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of different botanical extracts and essential oils on the reduction of the mycelial growth and germination of sclerotia of *S. cepivorum*. In the first experiment, the culture broth of *S. cepivorum* (PDA) was amended with aqueous and ethanolic extracts (20%, m:v) of *Ageratum conyzoides*, *Ruta graveolens*, *Zingiber officinale*, *Crocus sativus*, *Allium sativum* and *Cymbopogon winterianus* at 1.000 or 10.000 ppm. In the second experiment, essential oils of *C. winterianus*, *Rosmarinus officinalis*, *Azadirachta indica* and *Eucalyptus citriodora* were added into PDA at 100, 200, 400, 800 or 1.200 ppm. All extracts reduced the mycelia growth of the fungus, depending on the interaction between concentration and the extractor utilized. At 10.000 ppm, aqueous extracts reduced the growth of the colony by 28,0% and 53,5%, especially *A. conyzoides* and *C. winterianus*. In its turn, none extract reduced the germination of the sclerotia. In the second experiment, the mycelial growth was inhibited as a result of the interaction between the type and concentration of the essential oil. At 1.200 ppm, essential oils of *C. winterianus* and *R. officinalis* completely inhibited the growth of the fungus, whereas the reduction induced by *A. indica* and *E. citriodora* oils were 77 e 83%, respectively. The germination of the sclerotia was inhibited only at 1.200 ppm, regardless the type of the oil, resulting in 5% of germination. As a conclusion, the extracts and the essential oils assessed have inhibitory substances to the growth of *S. cepivorum*.

Key words: *Allium* spp., Control of diseases, White rot.

INTRODUÇÃO

A podridão branca, causada pelo fungo *S. cepivorum*, é uma doença que pode ocorrer em todas as espécies do gênero *Allium*; porém, com mais frequência na cultura do alho e cebola e nas regiões onde se cultiva na estação fria do ano. No Brasil, tem sido registrada em Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (Jaccoud Filho *et al.*, 1985). Sua forma de ocorrência localizada faz com que a estimativa de perdas, na média, seja baixa; porém, nas lavouras afetadas pode inviabilizar em 100% a produção, tornando o local impróprio para cultivos subsequentes de aliáceas. Muitos locais infestados podem não apresentar plantas doentes em determinado ciclo e manifestar-se nos próximos cultivos, provavelmente pelas condições edafoclimáticas desfavoráveis à infecção ou pela intensa atividade biológica sobre o fungo (Entwistle, 1990).

O controle do patógeno é realizado principalmente através do controle químico, muitas vezes demandando altas doses ou maior frequência de aplicação do fungicida. O controle químico tem sido utilizado através do tratamento de solo (Nunes; Kimati, 2004). O uso dos fungicidas, principalmente tebuconazole, iprodione, procimidone e vinclozolin podem ser usados no controle do fungo, com eficiência variável entre os produtos (Zewide *et al.*, 2007; Guerrero; Checa, 1990; Sánchez *et al.*, 2002). Entretanto, não são eficazes em altas densidades de inóculo (Fullerton; Stewart, 1991).

O uso de agentes químicos para controle de doenças e pragas tem sido muito questionado atualmente, uma vez que é crescente a preocupação por parte da população em consumir alimentos mais saudáveis, e com menor impacto ambiental no processo de produção. O uso de antimicrobianos naturais, a exemplo dos óleos essenciais e extratos vegetais, pode ser uma alternativa interessante de reduzir a aplicação de agrotóxicos (Cutler, 1999).

Na literatura há relato de muitas plantas medicinais, aromáticas e condimentares que apresentam propriedades tóxicas a uma ampla gama de fitopatógenos (Park *et al.*, 2007; Tabanca *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2010; Combrinck *et al.*, 2011), ainda que o mecanismo de ação antimicrobiana das substâncias presentes nos extratos e nos óleos essenciais não é totalmente compreendido (Bakkali *et al.*, 2008; Negi, 2012).

Considerando a alta demanda de alimentos mais saudáveis, o impacto que as doenças fúngicas podem ocasionar na produção agrícola e o potencial dos extratos e óleos essenciais no manejo da podridão branca, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos extratos aquosos e etanólicos de mentrasto (*Ageratum conyzoides*), arruda (*Ruta graveolens*), gengibre (*Zingiber officinale*), açafrão (*Crocus sativus*), alho

(*Allium sativum*) e citronela (*Cymbopogon winterianus*), bem como os óleos essenciais de citronela, alecrim (*Rosmarinus officinalis*), nim (*Azadirachta indica*) e eucalipto citriodora (*Eucalyptus citriodora*) sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de *S. cepivorum* em condições de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais de realização dos experimentos

Os experimentos relacionados ao isolamento e seleção dos antagonistas foram realizados no Laboratório de Bioquímica, Fitopatologia e Genética Molecular da Universidade Federal de Viçosa, *Campus* de Rio Paranaíba (UFV-CRP) e no Laboratório de Melhoramento Vegetal e Genética do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Obtenção do patógeno

O isolado de *S. cepivorum* utilizado neste estudo foi obtido de escleródios formados na superfície de bulbos de alho infectados, provenientes de produção de alho em Rio Paranaíba-MG. Em laboratório, os escleródios foram desinfestados em álcool a 50% e hipoclorito de sódio a 0,5%, por 30 e 60 segundos, respectivamente. Em seguida, foram enxaguados em água destilada estéril e transferidos para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA). As placas de Petri foram mantidas a 20 °C. Após a germinação e crescimento do fungo, retirou-se um disco de micélio de 5 mm da borda da colônia e transferiu-se para placa de Petri, incubando o patógeno em BOD a 20 °C no escuro.

Preparo dos extratos vegetais

Folhas de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor), de arruda (*Ruta graveolens* L.) e de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), rizomas de açafrão (*Crocus sativus* L.) e de gengibre (*Zingiber officinalis* (Willd). Roscoe) e bulbos de alho (*Allium sativum* L.) foram lavados em água corrente e desinfestados em hipoclorito de sódio, a 0,5%, durante 10 minutos, a fim de eliminar a presença de possíveis microrganismos presentes na superfície das plantas.

Os materiais vegetais foram transferidos para um copo de liquidificador contendo água destilada estéril ou etanol a 96°C e triturados por 1 minuto na proporção de 20% (200 g.L⁻¹). Os extratos aquosos foram colocados em infusão em banho-maria

durante 1 hora a 60 °C. A separação dos extratos do material sólido residual foi realizado por filtração utilizando papel filtro de poros de tamanho de 3 µm e gramatura de 80 g.m⁻². Os extratos foram filtrados em membrana de nitrocelulose (Millipore®) de 0,2 µm e armazenados em tubos vedados e envoltos em papel alumínio e mantidos em geladeira a 4 °C.

Efeito de extratos vegetais sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de *Sclerotium cepivorum*

Os extratos vegetais foram adicionados ao meio BDA fundente (45 °C), juntamente com o adjuvante Tween 80 a 0,05% e o antibiótico sulfato de estreptomicina na concentração de 500 mg.L⁻¹. Em seguida, o meio de cultura contendo ou não os extratos vegetais foi distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após a solidificação do meio, discos de micélio (6 mm) de *S. cepivorum* foram retirados das bordas de colônias com sete dias de idade e depositados no centro das placas de Petri contendo BDA. As placas foram mantidas em BOD no escuro a 20 °C por 10 dias. Após as colônias fúngicas em placas contendo apenas BDA (testemunha) atingirem toda a superfície do meio, o experimento foi finalizado, culminando com a medição do diâmetro das colônias com auxílio de paquímetro digital.

Para se avaliar o efeito dos extratos sobre a germinação de escleródios, após a solidificação dos meios acrescidos dos extratos vegetais, seis escleródios foram depositados em pontos equidistantes na superfície do BDA mantido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Os escleródios foram obtidos a partir de uma cultura pura em BDA com 12 dias de idade. As placas foram mantidas a 20 °C no escuro durante sete dias, quando o número de escleródios germinados foi avaliado com auxílio de microscópio estereoscópico.

O delineamento utilizado foi do tipo inteiramente casualizado em esquema fatorial 7x2x2, sendo seis espécies de plantas (mentrasto, arruda, citronela, açafraão, gengibre e alho) e a testemunha, duas concentrações (1.000 e 10.000 ppm) e dois extratores (água destilada estéril e etanol). A testemunha continha apenas o solvente puro (água destilada estéril ou etanol) acrescidos ao meio BDA. Os tratamentos foram repetidos cinco vezes.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Levene para testar a normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Realizou-se a análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade) e os tratamentos foram

comparados por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com o uso do pacote estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft, 2004).

Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de *Sclerotium cepivorum*

Foram utilizados óleos essenciais comerciais de citronela, alecrim (*Rosmarinus officinales* L.), nim (*Azadiractina indica*) e eucalipto citriodora (*Eucalyptus citriodora* Hook) nas concentrações de 100, 200, 400, 800 ou 1.200 ppm.

A adição dos óleos essenciais ao meio de cultura, a condução e avaliação do experimento foram similares ao experimento anterior, exceto a duração do experimento que foi de 15 dias e a germinação foi avaliada usando ágar-água em substituição ao BDA.

O delineamento utilizado foi do tipo inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x5+1, sendo quatro óleos vegetais (citronela, alecrim, nim e eucalipto), cinco concentrações (100, 200, 400, 800 e 1.200 ppm) e o tratamento testemunha contendo apenas meio BDA ou AA. Os tratamentos foram repetidos cinco vezes.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Levene para averiguação das pressuposições de normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Em seguida, procedeu-se a análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade) e os tratamentos de ordem qualitativa (tipos de óleos vegetais) foram comparados por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os fatores quantitativos (doses dos óleos essenciais) foram avaliados após ajuste de equações de regressão, baseado no teste de “t” dos coeficientes dos modelos de regressão a 1% de probabilidade. Os óleos e as respectivas concentrações foram comparados com a testemunha por meio do teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com auxílio do pacote estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos extratos vegetais sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de *Sclerotium cepivorum*

O crescimento micelial de *S. cepivorum* foi influenciado pela interação entre as espécies vegetais, concentrações e extratores utilizados (Tabela 1). De forma geral,

nenhum extrato, independente da concentração, inibiu mais de 54% o crescimento micelial do fungo.

Tabela 1. Efeito dos extratos vegetais sobre o crescimento micelial (diâmetro da colônia em cm) de *Sclerotium cepivorum* em função das concentrações (1.000 ou 10.000 ppm) e extratores (água destilada ou etanol).

Plantas	Concentração (ppm) x Solvente							
	10.000 x Etanol		10.000 x Água		1.000 x Etanol		1.000 x Água	
Mentrasito	7,12	Ab*	4,18	Bc	7,5	Aabc	7,96	Aab
Arruda	5,48	Bc	6,3	ABb	7,1	Ac	7,16	Ab
Açafrão	7,1	Ab	6,4	Ab	6,18	Acd	7,26	Ab
Alho	7,58	Aab	6,06	Bb	8,7	Aab	7,42	ABab
Citronela	9,0	Aa	4,32	Cc	7,14	Bbc	9,0	Aa
Gengibre	8,78	Aa	6,48	Bb	4,94	Cd	9,0	Aa
Testemunha	9,0	Aa	9,0	Aa	9,0	Aa	9,0	Aa

*Médias seguidas por letras maiúsculas na linha e letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Analisando os extratos etanólicos na dose de 10.000 ppm (Tabela 1), o extrato de arruda foi o que causou maior inibição do crescimento micelial de *S. cepivorum* (39,1%), em comparação com os demais extratos e a testemunha. A inibição induzida pelos extratos de mentrasito e açafrão foi de 20,8 e 21,1%, respectivamente, frente à testemunha.

Por sua vez, todos os extratos aquosos limitaram o crescimento do fungo na dose de 10.000 ppm, com reduções variando entre 28,0% e 53,5%. Os extratos de mentrasito e citronela inibiram em mais de 50% o diâmetro da colônia fúngica. Na concentração de 10.000 ppm, a água se mostrou mais eficiente como extrator de substâncias inibidoras a *S. cepivorum* do que o etanol, principalmente quando os materiais vegetais foram de mentrasito, alho, citronela e gengibre.

Em relação à concentração de 1.000 ppm, os extratos etanólicos de gengibre, citronela, arruda e açafrão reduziram o crescimento micelial do patógeno, com destaque para o extrato de gengibre, que limitou o diâmetro da colônia em 45,1% em relação a testemunha. Nenhum extrato aquoso na concentração de 1.000 ppm teve efeito antifúngico acima de 21% e somente os extratos de arruda e açafrão diferiram da testemunha (Tabela 1). Considerando a concentração de 1.000 ppm, o etanol foi mais eficiente na extração de substâncias inibidoras de *S. cepivorum* a partir dos tecidos de citronela e gengibre.

Em relação ao experimento de germinação de escleródios não houve diferença significativa entre os tratamentos, ocorrendo 100% de germinação em todos os tratamentos aos sete dias de avaliação (dados não apresentados), independente da espécie de planta, extrator e concentração.

Poucas pesquisas foram realizadas com o objetivo de avaliar o efeito fungitóxico de extratos vegetais sobre o fungo *S. cepivorum*. Todavia, com base em alguns trabalhos diretamente relacionados com a espécie ou com o gênero do fungo demonstram o potencial de utilização desses compostos no controle alternativo do patógeno. Em uma dessas investigações, os extratos de folhas de *Brachiaria humidicola*, *Crotalaria paulina*, *Eucalyptus citriodora* e *Brassica oleracea* var. *capitata* foram avaliados quanto ao potencial de inibir o crescimento micelial e a germinação de escleródios de *S. cepivorum* (Pinto *et al.*, 1998). Os autores observaram que extratos aquosos e acetona-água de folhas de *E. citriodora* e *B. oleraceae* var. *capitata* tiveram pouco efeito sobre o crescimento micelial. No entanto, o extrato aquoso de folhas de *C. paulina* inibiu o crescimento micelial em 67, 53 e 27%, nas doses de 100, 1.000 e 10.000 ppm, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos com extratos de folhas de *E. citriodora* em 1.000 e 10.000 ppm em acetona-água, inibindo completamente o crescimento micelial (Pinto *et al.*, 1998).

Em relação à germinação de escleródios de *S. cepivorum*, Pinto *et al.* (1998) notaram reduzido efeito (menos de 10% de inibição) dos extratos aquosos de folhas de *Brachiaria humidicola*, *Crotalaria paulina*, *E. citriodora* e *Brassica oleracea* var. *capitata*, mesmo em concentrações de 10.000 ppm. Entretanto, ao utilizarem o extrator acetona-água, na concentração de 1.000 ppm de *E. citriodora*, foi obtido 100% de inibição de germinação dos escleródios, demonstrando que a escolha do extrator possui grande influência nos resultados. Montes-Belmont e Prados-Ligero (2006), por sua vez, testaram a fungitoxicidade ‘in vitro’ de extratos aquosos de 15 espécies de plantas em concentração de 5% sobre *S. cepivorum*. Na ocasião, os extratos aquosos de flores de *Syzygium aromaticum* e *Pimenta dioica* inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo e a formação de escleródios.

O potencial fungitóxico de plantas avaliadas neste trabalho já foi comprovado em pesquisas realizadas em diversos países (Tylkowska; Dorna, 2001; Kane *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2006; Celoto *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2009), ainda que *S. cepivorum* não tenha sido utilizado como patógeno-alvo. Entretanto, o efeito desses extratos é variável, pois dependem da espécie do patógeno estudada e da metodologia usada (concentração, dose, extrator, entre outros). Domingues *et al.* (2009), por

exemplo, verificaram que o extrato hexânico de arruda inibiu completamente a germinação de escleródios de *S. rolfsii*. Os extratos hidroetanólicos da mesma planta, de mentrasto e gengibre inibiram em mais de 90% a germinação dos esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Celoto *et al.*, 2008).

Se por um lado o tipo de solvente utilizado e a concentração dos extratos no meio de cultura podem influenciar nos resultados, apenas determinadas etapas do ciclo de vida do patógeno podem ser inibidas pelos extratos vegetais, tais quais, germinação, crescimento micelial (colonização) e esporulação (reprodução). Por exemplo, o extrato aquoso de gengibre na concentração de 25% inibiu o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em 92,5%; mas a redução na produção de escleródios não ultrapassou 30% (Rodrigues *et al.*, 2006). Extratos dessa mesma planta também inibiram de forma pronunciada o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* (Kane *et al.*, 2002), *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola*, *Botrytis allii* e *Stemphylium botryosum* (Tylkowska; Dorna, 2001). Considerando a considerável redução do crescimento de *S. cepivorum* na presença de extratos etanólicos de mentrasto e citronela, a 10.000 ppm, e gengibre a 1.000 ppm (Tabela 1), é possível que substâncias fungicidas ou fungistáticas de amplo espectro estejam presentes nos extratos da planta, carecendo de novas investigações.

Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento micelial e germinação de escleródios de *Sclerotium cepivorum*

Houve interação significativa entre óleos essenciais e concentrações testadas sobre o crescimento micelial de *S. cepivorum*.

Nenhum óleo essencial inibiu o crescimento micelial do patógeno nas concentrações de 100 e 200 ppm quando comparados com a testemunha, similarmente ao observado com os óleos de citronela e alecrim a 400 ppm (Tabela 2). Por sua vez, os óleos de nim e eucalipto a 400 ppm inibiram o crescimento fúngico em 22% e 33%, respectivamente.

Nas concentrações de 800 e 1.200 ppm, os óleos essenciais de todas as plantas reduziram o diâmetro da colônia do patógeno, com destaque para os óleos de citronela e alecrim a 1.200 ppm (100% de inibição).

O efeito das diferentes doses de cada óleo essencial na inibição do crescimento micelial de *S. cepivorum* foi ajustado a modelos exponenciais ($r^2 > 0,97$) para os óleos de citronela e alecrim e lineares ($r^2 > 0,96$) para os óleos de nim e eucalipto (Figura 1). Assim, os pontos críticos para os óleos de citronela e alecrim foram 256,6 ppm e 263,1

ppm, respectivamente; enquanto que o aumento das doses de óleos de nim e eucalipto limitaram proporcionalmente o crescimento micelial do patógeno.

Na concentração de 1.200 ppm, os óleos de citronela e alecrim inibiram totalmente o crescimento micelial de *S. cepivorum*, enquanto que os óleos de nim e eucalipto citriodora as inibições foram de 77% e 83%, respectivamente.

Tabela 2. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* após 15 dias de cultivo a 20C em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) acrescido de diferentes concentrações de óleos essenciais de quatro espécies de plantas.

Óleo essencial	% de inibição				
	1.200	800	400	200	100
Citronela	100 a ⁽¹⁾	33 a	0 b*	0 a*	0 a*
Alecrim	100 a	22 b	0 b*	0 a*	0 a*
Nim	77 b	39 a	22 a	0 a*	0 a*
Eucalipto	83 b	33 a	33 a	0 a*	0 a*
Média	90	34,5	11	0	0
Testemunha	0	-	-	-	-

⁽¹⁾Médias seguidas por letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *Médias seguidas por um asterisco não diferem significativamente da testemunha, a 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Diferentes óleos essenciais podem limitar o crescimento de fungos formadores de escleródios, a exemplo de *S. cepivorum*. Pitarokili *et al.* (2002) observaram que o crescimento radial de *S. sclerotiorum* foi totalmente inibido pelo óleo essencial de sálvia (*Salvia sclarea*) na concentração de 1.000 ppm, ao passo que o crescimento de *S. cepivorum* foi inibido em 94% em 2.000 ppm. Além disso, o óleo exibiu um efeito fungicida sobre *S. sclerotiorum* na concentração de 2.000 ppm. Kumar *et al.* (2007) demonstraram amplo espectro antifúngico, inclusive a *S. rolfsii* de óleo de mastruz (*Chenopodium ambrosioides*) na concentração de 100 ppm, com 100% de inibição de crescimento micelial. Benine *et al.* (2010) também observaram total inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii* quando submetido ao óleo essencial de alfavaca (*Ocimum gratissimum*).

Todos os escleródios de *S. cepivorum* germinaram na testemunha e nas parcelas contendo os óleos essenciais das quatro plantas nas concentrações de 100, 200, 400 e 800 ppm; enquanto que apenas 5% dos escleródios, em média, germinaram em BDA contendo os óleos na concentração de 1.200 ppm, independentemente da planta (dados não apresentados). Assim, é possível notar que é necessária maior concentração de óleo

essencial para limitar a germinação dos escleródios do que o crescimento micelial do fungo.

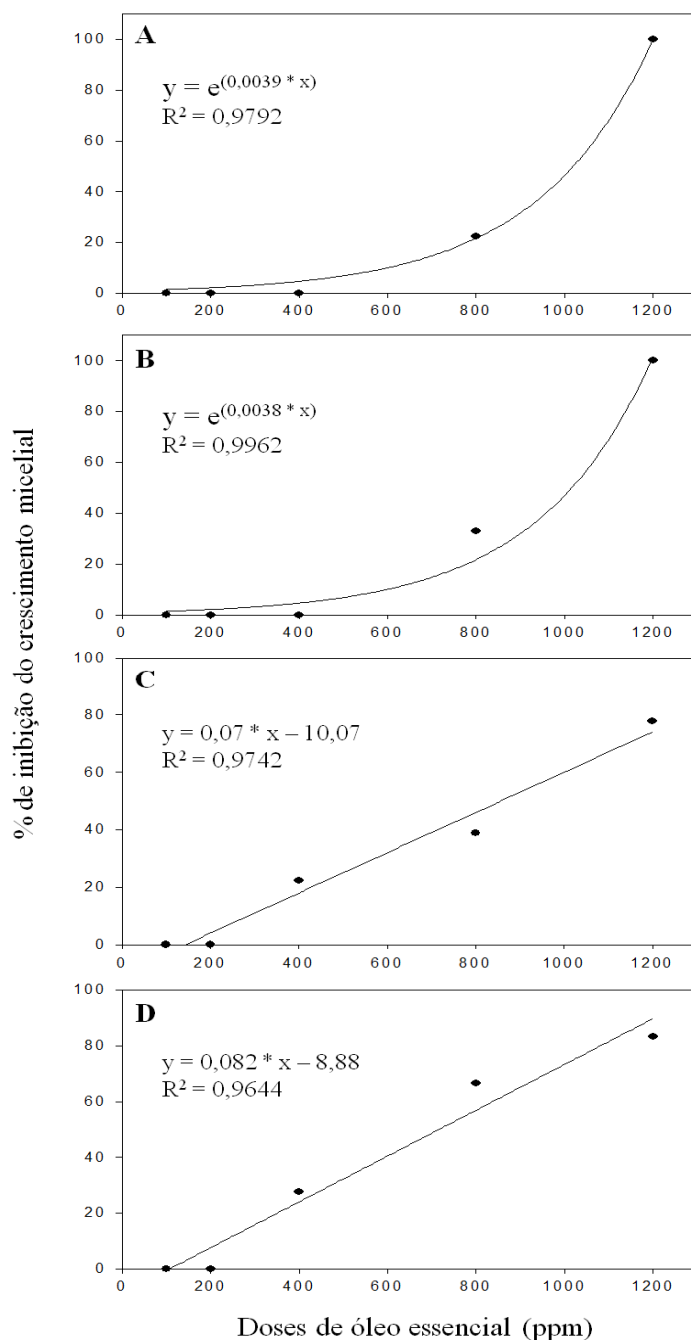


Figura 1. Efeito das concentrações (ppm) de óleos essenciais sobre a inibição do crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* após 15 dias de incubação. (A) óleo de citronela, (B) óleo de alecrim, (C) óleo de nim e (D) óleo de eucalipto. Os coeficientes dos modelos de regressão foram significativos pelo teste de “t” a 1% de probabilidade.

Diversos autores demonstraram o potencial fungitóxico dos óleos essenciais de citronela, alecrim, nim e eucalipto citriodora em relação à inibição do crescimento

micelial de *F. oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora coffeicola*, *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani* (Salgado *et al.*, 2003; Triana; González, 2009; Soylu *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011). O mecanismo de ação mais provável dos óleos essenciais está relacionado com danos às membranas celulares dos patógenos, afetando a estrutura das suas diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios. Os componentes que determinam a atividade biológica dos óleos essenciais são principalmente os terpenos, terpenóides e compostos aromáticos (Bakkali *et al.*, 2008).

Neste trabalho foi avaliada apenas a inibição do crescimento micelial e da germinação de escleródios. Novos estudos devem ser realizados a fim de verificar se tais extratos e óleos inibem a produção de escleródios de *S. cepivorum* ou mesmo a sua sobrevivência no solo. Adicionalmente, outras formas de extração, diferentes concentrações, a identificação das frações majoritárias com potencial de inibição são necessários, assim como a aplicação dos compostos no solo em condições controladas e a campo, a fim de verificar o real potencial do uso destes extratos.

CONCLUSÕES

Todos os extratos vegetais testados limitam o crescimento micelial de *S. cepivorum*, dependendo da concentração e do extrator. O menor crescimento micelial do fungo foi obtido com os extratos aquosos de mentrasto e citronela na dose de 10.000 ppm, inibindo em mais de 50% o crescimento da colônia. Nenhum extrato vegetal, independente da dose e do extrator não apresentou efeito sobre a germinação dos escleródios.

Os óleos essenciais de citronela (*C. citratus*), alecrim (*R. officinalis*), nim (*A. indica*) e eucalipto citriodora (*E. citriodora*) inibiram o crescimento micelial entre 77% e 100% na concentração de 1.200 ppm. A inibição de germinação de escleródios foi observada apenas na concentração de 1.200 ppm, com média de 5% de escleródios germinados.

LITERATURA CITADA

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BENINE, P.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; KLAIS, E.C.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; MESQUINE, R.M.; STANGARLIN, J.R.; TOLENTINO JÚNIOR, J.B. Efeito in vitro do óleo essencial e extrato aquoso de *Ocimum gratissimum* colhido nas quatro estações do ano sobre fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p.677-683, 2010.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v.33, p.344-349, 2011.

COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, v.26, p.1337-1348, 2007.

CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J. **Biological active natural products: agrochemicals**. Boca Raton: CRC Press, 1999. 299 p.

DOMINGUES, R.J.; SOUZA, J.D.F.; TÖFOLI, J.G.; MATHEUS, D.R. Ação *in vitro* de extratos vegetais sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.643-649, 2009.

EARNSHAW, D.; MCDONALD, M.R.; BOLAND, G.J. Interaction among isolates and mycelial compatibility groups of *Sclerotium cepivorum* and cultivars of onion (*Allium cepa*). **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, p.387–391, 2000.

ENTWISTLE, A.R. Root diseases in Onions and Allied Crops. In: RABINOWITCH, H.D.; BREWSTER, J.L. (Ed.). **Agronomy, Biotic Interactions, Pathology, and Crop Protection**. Florida: CRC Press, 1990. p.103-154.

FULLERTON, R.A; STEWART, A. Chemical control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in the Pukekohe district of New Zealand. **New Zealand Journal Crop Horticulturae**, v.19, p.121-7, 1991.

GUERRERO G.O.; CHECA, C.O.E. Evaluation of fungicides for control of garlic white rot *Sclerotium cepivorum* Berk. in Narino. **Fitopatologia Colombiana**, v.14, p.56-60, 1990.

KANE, P.V.; KSHISARGAR, C.R.; JADHAV, A.C.; PAWAR, N.B. *In vitro* evaluation of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* from chickpea. **Journal of Maharashtra Agricultural Universities**, v.27, p.101-102, 2002.

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

LEE, Y.; KIM, J.; SHIN, S.; LEE, S.; PARK, I. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour Fragrance Journal**, v.23, p.23-28, 2008.

MONTES-BELMONT, R.; PRADOS-LIGERO, A.M. Influence of plant extracts on *Sclerotium cepivorum* development. **Plant pathology Journal**, v.5, p.373-377, 2006.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v.156, p.07–17, 2012.

PARK, I.; KIM, J.; LEE, S.; SHIN, S. Nematicidal activity of plant essential oils and components from Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*) and Litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Nematology**, v.39, p.275–279. 2007.

PEREIRA, R.B.; LUCAS, G.C.; PERINA, F.J.; RESENDE, M.L.V.; ALVES, E. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.115-123, 2011.

PINTO, C.M.F.; MAFFIA, L.A.; BERGER, R.D.; MIZUBUTI, E.S.G.; CASALI, V.W.D. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. **Plant Disease**, v.82, p.1142-1146, 1998.

PINTO, C.M.F.; MAFFIA, L.A.; CASALI, V.W.D.; CARDOSO, A.A. In vitro effect of plant leaf extracts on mycelial growth and sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*. **Journal of Phytopathology**, v.146, p.421-425, 1998.

PINTO, J.M.A.; SOUZA, E.A.; OLIVEIRA, D.F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop Protection**, v.29, p.838-842, 2010.

PITAROKILI, D.; COULADIS, M.; PETSIKOS-PANAYOTAROU, N.; TZAKOU, O. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6688–6691, 2002.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.124-128, 2007.

SALGADO, A.P.S.P.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J.P.; ABREU, C.M.P.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.249-254, 2003.

SÁNCHEZ, F.D.; MEJÍA, E.Z.; KAWASOE, S.O.; VALENZUELA, A.A.; HERNÁNDEZ, V.A.G.; ANGEL, D.N.; PACHECO I.T. Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su control mediante Tebuconazole en ajo (*Allium sativum* L.). **Revista de Fitotecnia Mexicana**, v.25, p.349-354, 2002.

SOYLU, E.M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.183-189, 2010.

STATSOFT, INC. **Statistica (data analysis software system)**, versão 7.0 (2004).
www.statsoft.com.

TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; HUSNU CAN BASER, K.; MINCSOVICS, E.; KHAN, S.I.; JACOB, M.R.; WEDGE, D.E. Characterization of volatile constituents of *Scaligeria tripartita* and studies on the antifungal activity against phytopathogenic fungi. **Journal of Chromatography B**, v.850, p.221–229, 2007.

TRIANA, A.C.; GONZÁLEZ, D.R. Efecto del oleo nim 50 CE sobre el crecimiento y desarrollo in vitro de hongos fitopatógenos del arroz (*Oryza sativa* Lin.). **Fitosanidad**, v.13, p.271-276, 2009.

TYLKOWSKA, K.; DORNA, H. Effects of cinnamon, garlic, greater celandine, ginger and chosen fungicides on the growth of pathogenic fungi isolated from onion, cabbage and carrot seeds. **Phytopathologia Polonica**, v.21, p.25-34, 2001.

ZEWIDE, T.; FININSA, C.; SAKHUJA, P.K. Management of white rot (*Sclerotium cepivorum*) of garlic using fungicides in Ethiopia. **Crop Protection**, v.26, p.856-866, 2007.