

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

THAYLA CHRISTIANE PUTRICK

**EFEITO DE PRODUTO COMERCIAL À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA  
DE LARANJA SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum*.**

CHAPADÃO DO SUL – MS  
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

THAYLA CHRISTIANE PUTRICK

**EFEITO DE PRODUTO COMERCIAL À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE  
LARANJA SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum*.**

Orientador: Prof. Dr. Gustavo de Faria Theodoro

Co- Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Nunes Costa

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal.

CHAPADÃO DO SUL – MS  
2016



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
Câmpus de Chapadão do Sul



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**DISCENTE: Thayla Christiane Putrick**

**ORIENTADOR (A): Prof. (a) Dr. (a) Gustavo de Faria Theodoro**

**EFEITO DE PRODUTO COMERCIAL À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DA  
CASCA DE LARANJA SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum***

Prof.(a) Dr.(a) Presidente Gustavo de Faria Theodoro

Prof.(a) Dr.(a) Elisangela de Souza Loureiro

Prof.(a) Dr.(a) Jaqueline Rosemeire Verzignassi

Chapadão do Sul, 25 de Abril de 2016.

## **DEDICATÓRIA**

**A minha mãe, Marcia Elisa Schwingel Putrick, “com admiração, por tudo que você constrói e ninguém vê”.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e pela concessão de tantas bênçãos ao longo destes anos, por ter me dado força e coragem para trilhar o caminho do bem;

Aos meus pais, Marcia Elisa Schwingel Putrick e Sergio Luiz Putrick, pelo apoio e amor que me levaram a conquistar mais essa meta, por quem me sinto honrada de ser filha;

A minha irmã, Thaynara Cristiane Putrick, pelo amor incondicional, por mesmo longe sempre estar comigo e da qual me orgulho muito;

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus Chapadão do Sul, e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal, pela oportunidade do aprimoramento dos conhecimentos e por sempre me receber de portas abertas;

A CAPES, pela concessão de bolsa e incentivo;

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo de Faria Theodoro, pela sua orientação e, paciência, apoio e compreensão. Por se disponibilizar a me repassar seus conhecimentos e por aceitar me guiar por mais essa empreitada de minha vida;

À minha co-orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Nunes Costa, pela sua orientação, que, além de dedicar seu tempo a ensinar em sala de aula, se responsabilizou em também passar os seus conhecimentos para o desenvolvimento do meu trabalho e que acima de tudo teve paciência com as minhas imperfeições durante essa jornada;

Aos pesquisadores Profa. Dra. Maria Luiza Nunes Costa e Profa. Dra. Lilian Maria Arruda Bacchi, por cederem os isolados de *Sclerotinia esclerotiorum*, que foram essenciais para a condução dos experimentos relacionados ao projeto de pesquisa e dissertação;

Ao pesquisador da Fundação Chapadão, Alfredo Riciere Dias, por suas contribuições para a condução destes experimentos;

Ao assistente administrativo Sinomar Moreira Andrade, por suas contribuições;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, por todos os ensinamentos transmitidos e apoio neste trabalho;

À Daly Roxana Castro Padilha e Mônica Zuffo, técnicas e amigas da UFMS, Campus Chapadão do Sul, que sempre me ajudaram e dispuseram seu tempo e contribuição técnica para a realização deste trabalho;

Ao técnico Kenio Batista Nogueira, pela contribuição técnica para a realização desse trabalho;

Aos estudantes de graduação que passaram pelo Laboratório de Fitopatologia;

Às minhas amigas e amigos Cátia Simon, Claudia Pirres de Mattos, Lennis Afraire, Jamile Benetão, Daniele Cecatto, Maria Cecatto, Magali Rost, Angela Cecatto, Samela, Caroline Welter, Alex Costa, Valmiré Littig, Antonio Robis, Otieres Cirino e Lélia Vanessa pelos dias agradáveis convívios, amizade e motivação;

Aos colegas da pós-graduação, pelas horas de estudo, colaboração e troca de conhecimento.

## RESUMO

PUTRICK, Thayla Christiane. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Controle alternativo de *Sclerotinia sclerotiorum* com óleo essencial da casca de laranja. Professor Orientador: Gustavo de Faria Theodoro

Os óleos essenciais são considerados fontes para o desenvolvimento de novos produtos naturais. A utilização desses óleos tem mostrado resultados promissores capazes de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos de grande importância econômica. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary é um patógeno necrotrófico e cosmopolita, de difícil controle em função da sua capacidade de produzir estruturas de sobrevivência no solo. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do produto comercial à base de óleo essencial da casca da laranja (Orobor N1) sobre o crescimento micelial e a germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Para avaliar o efeito do produto sobre o crescimento micelial, foram utilizadas as dosagens de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 mL.100 L<sup>-1</sup> de água, do produto comercial (Orobor N1), que foram incorporadas, ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida foi vertido em placas de Petri e, após a solidificação, depositou-se um disco de 6 mm de BDA, contendo micélio dos isolados fungo. As placas foram incubadas a 22 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações consistiram em medições diárias do diâmetro médio da colônia, até que o fungo se desenvolvesse até as margens da placa. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial com cinco isolados x seis concentrações, com quatro repetições. Para a avaliação da germinação carpogênica, houve a deposição de 200 g de solo autoclavado em caixas tipo gerbox, havendo a adição de água destilada esterilizada até que atingisse 62% da capacidade de campo do solo. Foram depositados 16 escleródios por caixa. Em seguida, foram aplicadas soluções, com pulverizador manual, com as mesmas concentrações do óleo essencial utilizadas no experimento anterior, completando assim 100% C.C. do solo. As caixas gerbox foram incubadas em B.O.D., a 19±2°C, fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial com cinco isolados x seis concentrações, com três repetições. As avaliações foram efetuadas contando-se o número de estipes e apotécios formados por caixa, aos 30, 45, 60 e 75 dias após a implantação do experimento. No crescimento micelial verifica-se que nas maiores concentrações houve significativo aumento da porcentagem de inibição e, a partir da concentração de 200 mL.100 L<sup>-1</sup>, também foi observada a redução da produção de escleródios. Verificou-se que o óleo essencial não inibiu a germinação carpogênica em nenhum dos isolados estudados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Mofo branco, fitoterapia, crescimento micelial, escleródio.

## ABSTRACT

PUTRICK, Thayla Christiane. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Alternative control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.), with essential oil of orange peel. Adviser: Gustavo de Faria Theodoro

Essential oils are considered as sources for the development of new natural products. The use of these oils has shown promising results able to control the development of plant pathogens of great economic importance. The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary is a necrotrophic and cosmopolitan pathogen, difficult to control due to its ability to produce survival structures on the ground. The objective of this work was to study the effect of the commercial product to the essential oil base orange peel (Orobor N1) on mycelial growth and carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. To evaluate the effect of the product on the mycelial growth were repeated dosages of 0, 50, 100, 150, 200 and 250 mL.100 L<sup>-1</sup> water the commercial product (Orobor N1), which were incorporated into the midst potato-dextrose-agar (PDA) culture. It was then poured into Petri dishes and, after solidification, is placed a disc of 6 mm PDA containing isolated mycelium of the fungus. The plates were incubated at  $22 \pm 2$  ° C and 12 hour photoperiod. Evaluations consisted of daily measurements of the average diameter of the colony until the fungus to develop up to the plate margins. The experimental design was completely randomized in a factorial design with five isolates x six concentrations, with four replications. To evaluate the germination carpogenic, there was a deposition of 200 g of sterilized soil in gerbox boxes, with the addition of sterilized distilled water until it reached 62% of the field capacity. Sclerotia were deposited 16 per box. Then solutions were applied with hand sprayer, with the same essential oil concentrations used in the previous experiment, thus completing 100% C.C. soil. The gerboxes were incubated in B.O.D. to  $19 \pm 2$  ° C, 12 hour photoperiod. The experimental design was completely randomized in a factorial design with five isolates x six concentrations, with three replications. Evaluations were made by counting the number of stipes and apothecia formed by box, 30, 45, 60 and 75 days after implantation of the experiment. In mycelial growth verifies that the higher concentrations a significant increase of percentage inhibition and concentration from 200 mL.100 L<sup>-1</sup> was also observed reduced sclerotia production. It was found that the essential oil did not inhibit germination carpogenic in any of the studied isolates.

**KEY-WORDS:** White mold, herbal medicine, mycelial growth, sclerotia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA	PÁGINA
CAPÍTULO	
1	<p style="text-align: center;">ATIVIDADE DO PRODUTO COMERCIAL A BASE DE ÓLEO DA CASCA DE LARANJA (<i>Citrus sinensis</i>) SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.</p>
1	<p>Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), média de quatro repetições, dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em relação às concentrações do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja (Orobor N1).....</p>
2	<p>Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM), média de quatro repetições, dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, em relação às concentrações do produto comercial base de óleo essencial da casca de laranja (Orobor N1).....</p>
3	<p>Produção de escleródios, média de quatro repetições, aos 14 dias após a implantação do experimento, dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, em relação às concentrações do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja (Orobor N1).....</p>
4	<p>Germinação carpogênica (%) total dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i> em função das concentrações do produto comercial a base de óleo essencial de casca de laranja.....</p>
5	<p>Número de estipes formados (NEF) total e número de apotécios formados (NAF) total dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i>, em função das concentrações do produto comercial a base de óleo essencial de casca de laranja.....</p>
	60
	61
	64
	66
	67

## LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
CAPÍTULO	ATIVIDADE DO PRODUTO COMERCIAL A BASE DE	
1	ÓLEO DA CASCA DE LARANJA ( <i>Citrus sinensis</i> ) SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE <i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i> .	
1	Origem dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , utilizados no experimento, Chapadão o Sul –MS, 2015. .....	56
2	Resumo da análise de variância do índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM), em função das concentrações do produto comercial (Orobor N1).....	59
3	Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação carpogênica, número de estipes formados (NEF) e número de apotécios formados (NAF), em função das concentrações do produto comercial (Orobor N1).....	65
4	Equações e coeficiente de determinação, dos gráficos representados na Figura 5.....	68

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 O patógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) De Bary .....	15
2.2 Ciclo da doença, epidemiologia e disseminação.....	17
2.3 Sintomatologia.....	23
2.4 Manejo da doença.....	24
2.4.1 Medidas de Controle baseadas na exclusão.....	25
2.4.2 Controle químico .....	27
2.4.3 Controle Biológico .....	28
2.4.3 Outros métodos de controle .....	30
2.4.4 Controle alternativo com óleos essenciais .....	31
5 REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 1 - ATIVIDADE DO PRODUTO COMERCIAL A BASE DE ÓLEO DA CASCA DE LARANJA ( <i>Citrus sinensis</i> ) SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	53
RESUMO.....	53
ABSTRACT .....	54
1 INTRODUÇÃO .....	55
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1 Obtenção dos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	56
2.2 Produção dos escleródios .....	57
2.3 Delineamento experimental e análise de dados.....	57
2.4 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade biológica do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja sobre o crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> .....	57
2.5 Avaliação do efeito do produto comercial à base de óleo essencial da casca de laranja sobre a germinação carpopôgica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade biológica do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja ( <i>Citrus sinensis</i> ) sobre o crescimento micelial de <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> .....	59

3.2 Avaliação do efeito do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja sobre a germinação carpogênica de <i>S. sclerotiorum</i> .....	64
4 CONCLUSÕES .....	69
5 REFERÊNCIAS.....	70

## 1 INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary é um fungo necrotrófico, que infecta e causa perdas econômicas com ampla gama de plantas hospedeiras (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON et al., 2006), entre elas se encontram culturas importantes, por exemplo soja, feijão, algodão, girassol, milho, batata, para citar apenas algumas (GRAU, 1988). O desenvolvimento deste patógeno é favorecido por alta umidade aliada a temperaturas amenas (CANOVA, 2014). Este patógeno se espalhou por todos os principais países produtores de soja do mundo, incluindo Canadá, Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e Índia (WRATHER et al., 2001).

As doenças conhecidas como mofo branco ou podridão recebem essas denominações em função dos sinais e sintomas causados pelo patógeno na planta, entretanto, não há um único sintoma relatado comum a todas as plantas infectadas pelo patógeno (LEITE, 2005; DAVIDSON et al., 2016). Entre os sintomas conhecidos estão a presença de lesões encharcadas nos órgãos afetados, de coloração parda e consistência mole, com micélio branco, de aspecto contonoso, cobrindo porções dos tecidos (LEITE, 2005).

Este patógeno sobrevive no solo na forma de estruturas chamadas escleródios, agregados de hifas que formam estruturas compactas que podem permanecer viáveis por um longo período de tempo, e germinam com temperaturas variando entre 15° a 21°C, alta umidade do solo e ar (ALMEIDA et al., 2005). A germinação proporciona a formação de micélio, que coloniza os tecidos da parte basal da planta, ou apotécios, que liberam ascósporos, esporos responsáveis pela infecção da parte aérea (ABDULLAH et al., 2008).

Presume-se que o mofo branco esteja presente em todas as regiões agrícolas produtoras de soja. A incidência da doença é favorecida por períodos prolongados de elevada umidade relativa do ar e temperaturas amenas (PURDY, 1979). Pode causar prejuízos de 100% na área infestada e em alguns casos levando até o abandono da mesma (PURDY, 1979).

O controle do mofo branco é considerado difícil devido à sobrevivência do fungo no solo, a grande gama de plantas hospedeiras, a ausência de cultivares resistente e a elevada produção de ascósporos, que são disseminados por longas

distâncias através da ação do vento. E também pode sobreviver em sementes na forma de micélio dormente ou com escleródios aderidos as mesmas (GARCIA, 2008). O controle químico é o método mais utilizado, sendo a principal estratégia aplicada, entretanto não é eficiente devido a dificuldade de se atingir os locais de infecção, localizados próximos ao solo, além das estruturas de resistência do patógeno presente em sua superfície (STEADMAN, 1979; GÖRGEN, 2009; AGUIAR, 2011).

Entre os métodos alternativos de controle de fitopatógenos tem-se a utilização de óleos essenciais e extratos oriundos de plantas. O potencial de uso dos óleos essenciais no controle de doenças de plantas tem sido muito pesquisado nos últimos anos, principalmente devido às suas propriedades antimicrobianas (GUIRALDO et al., 2004; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Esses produtos estão sendo estudados para a síntese de novas moléculas fungicidas, assim como na indução de resistência nas plantas e também na utilização direta da aplicação do extrato da planta cultivada (GARCIA, 2008).

O mofo branco apresenta poucos estudos de métodos alternativos de controle, tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”. Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar o efeito *in vitro* do óleo essencial da casca da laranja no crescimento micelial e na germinação carpogênica dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary

*Sclerotinia sclerotiorum* foi descrito por Antony De Bary em 1884 e o primeiro registro de ocorrência deste patógeno no Brasil foi feito em 1921, na cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) (CHAVES, 1964). No cerrado, o primeiro relato ocorreu no ano 2000, na região Centro-Oeste, que na época era considerada uma doença de pouca importância, por ocorrer esporadicamente em anos com baixas temperaturas (CASSETARI NETO et al., 2010). Já, na cultura da soja, foi detectado pela primeira vez na Hungria em 1924 e, posteriormente, nos Estados Unidos, em 1946 (GRAU, 1989). No Brasil, ocorreu no estado do Paraná, em 1975 (FERREIRA et al., 1979).

É considerado um dos maiores e mais devastadores patógenos de plantas da atualidade por provocar grandes perdas econômicas na agricultura, além de se encontrar disseminado nos cinco continentes em diferentes países (BERUSKI, 2013), em regiões produtoras, sejam elas temperadas, subtropicais ou tropicais (LEITE et al., 2000). Ele se espalhou nos principais países produtores de soja do mundo Canadá, Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e Índia (WRATHER et al., 2001).

*Sclerotinia sclerotiorum* é o agente etiológico do mofo branco, possui uma ampla gama de nomes, mais de 60, pode ser empregada para se referir a doenças causadas por este (BERUSKI, 2013). Dentre os quais se encontram podridão branca da haste da soja, podridão da haste de esclerotinia ou podridão branca de esclerotinia (PURDY, 1979), recebe esses nomes em função dos sintomas e sinais causados pelo patógeno na planta (LEITE, 2005). Segundo Reis et al. (2011a), a designação mofo branco é o que melhor contribui para a diagnose da doença.

O fungo é classificado taxonomicamente no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Discomycetes, Ordem Helotiales, Família Sclerotiniaceae, Gênero *Sclerotinia* (AGRIOS, 1997; HAWKSWORTH et al., 1995). Pertence ao grupo dos fungos mitospóricos, subgrupo dos Hifomycetos (AGRIOS, 1997).

A família Sclerotiniaceae inclui espécies de fungos que produzem ascos inoperculados, que contém oito esporos produzidos através de meiose, a partir de apotécio estipado de coloração marrom, o qual se origina do estroma do escleródio (WHETZEL, 1945). O escleródio se forma pela agregação de hifas somáticas melanizadas, possui formato irregular, com 2 a 20 milímetros de diâmetro e são estruturas de resistência a condições adversas (WHETZEL, 1945). É uma característica de todos os membros da Ordem Helotiales (BERUSKI, 2013).

As epidemias de mofo branco estão se tornando cada vez mais recorrentes, desencadeadas pelas condições meteorológicas favoráveis e pela quantidade de inóculo inicial presente na superfície do solo. São desencadeadas por condições ambientais favoráveis tais como temperaturas inferiores a 30 °C e umidade na superfície da planta por 12 a 16 horas, juntamente com molhamento foliar contínuo de 42 a 72 horas. Além disso, a ocorrência de precipitações durante o período mais suscetível da planta hospedeira é pré-requisito para o desenvolvimento do mofo branco (STEADMAN, 1983).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um patógeno que possui hábito necrotrófico, ou seja, sobrevive em restos de culturas e sobrevive por longo período de tempo no ambiente, podendo permanecer viável por até oito anos em condições ambientais desfavoráveis (STEADMAN, 1983; VENNETT, 1998).

Segundo Ferraz et al. (2003) o *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo inespecífico, e é considerado um dos patógenos de plantas mais bem sucedidos, devido a sua ampla gama de hospedeiros, dificultando assim o seu controle por restringir o número de culturas não hospedeiras que poderiam ser utilizadas na rotação de culturas visando reduzir a presença de inóculo no solo.

Segundo Boland e Hall (1994) este fungo é patogênico a 78 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas, infectando espécies economicamente importantes como a soja, o feijão, o algodão, o girassol, o nabo forrageiro, a canola, a batata, o tomate, a ervilha, a ervilhaca, o alface, a chicória, o repolho, a couve-flor, a cenoura e entre outras (PAVAN et al., 2005; REIS et al., 2011a). Também há relatos de plantas daninhas hospedeiras do fungo como amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), caruru (*Amaranthus deflexus* L.), corda de viola (*Ipomoea nil* (L.) Roth), erva-quente (*Borreria alata* Aubl), fazendeiro (*Galinsoga parviflora* Cav.), guanxuma (*Sida rhombifolia* L.), picão preto (*Bidens pilosa* L.), maria-mole (*Senecio brasiliensis* Less.) (HOMECHIN, 1982). Apesar dos relatos de ocorrerem em sua

maioria em dicotiledônias, também pode ocorrer em algumas monocotiledôneas como cebola e tulipa (BOLAND; HALL, 1994).

Mediante os fatos citados anteriormente, evidencia-se a grande versatilidade ecológica do patógeno e a sua adaptação aos diferentes ambientes e plantas hospedeiras, além da dificultar seu controle por meio da rotação de culturas (PELTIER et al., 2012).

Segundo Purdy (1979), as perdas na produção agrícola, ocasionadas em decorrência da doença provocada por *Sclerotinia sclerotiorum*, podem atingir até 100%, em determinados casos. Essas perdas, podem atingir milhões de dólares anualmente, sendo estas, diretamente relacionadas com perda no rendimento da cultura e/ou indiretamente com a redução na qualidade da semente (PURDY, 1979). De acordo com o mesmo autor, há também perdas atribuídas às tentativas de controle do patógeno e ao “abandono” de áreas de cultivo com culturas de valor econômico, para culturas menos lucrativas ou até mesmo que não geram lucros, visando reduzir o inóculo do patógeno no local.

## 2.2 Ciclo da doença e epidemiologia

O ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum* tem início na fase de sobrevivência, com a produção dos escleródios, o qual contribui com o aumento da fonte de inóculo, além de assegurar a presença do patógeno no ambiente de uma safra para outra. Possui papel importante no ciclo patógeno-hospedeiro, por serem estruturas de sobrevivência, permitem a manutenção de sua viabilidade por um longo período de tempo, quando as condições ambientais se encontram desfavoráveis ou na ausência de hospedeiros. Steadman (1983) e Vennett (1998) relataram que podem permanecer viáveis por até oito anos no solo.

Os ascósporos são compostos por uma massa de hifas, em três camadas distintas, a parte externa é uma parede grossa e rica em melanina, que atribui coloração negra à estrutura, além de conferir proteção contra condições adversas e da degradação microbiana (BOLTON et al., 2006). Na sequência, há uma parede fina denominada córtex e, internamente, a medula branca, que é composta por micélio dormente do fungo (ROCHA, 2007). De acordo com Nelson (1998), a

durabilidade da estrutura é devida a sua constituição física dura e a proteção externa conferida pela melanina.

A formação dos escleródios ocorre em três estágios de desenvolvimento. Primeiro há agregação das hifas para formar uma massa branca que inicialmente pode ser chamada de escleródio. A segunda parte consiste no crescimento e desenvolvimento das hifas, quando ocorre também agregação adicional de hifas que visa aumentar seu tamanho. No último estágio ocorre a deposição de melanina nas células da casca e também a consolidação interna, nesta fase ocorre a delimitação e maturação da superfície do escleródio (TOWNSEND; WILLETTS, 1954).

Os escleródios possuem formato irregular e seu tamanho varia drasticamente dependendo do hospedeiro, sendo que no girassol pode medir mais de 35 cm de diâmetro, enquanto no feijão pode medir de 2 a 10 mm (BOLTON et al., 2006).

A iniciação e a maturação dos escleródios são afetadas por vários fatores, tais como fotoperíodo, temperatura, concentração de oxigênio, fatores mecânicos e nutrientes (HAREL et al., 2005). A redução do potencial de água aumenta a sobrevivência dos escleródios, em condições de saturação do solo, estes sobrevivem por pouco tempo, em contra partida, a umidade do solo favorece a sua germinação (ABREU, 2014). Temperaturas elevadas, acima dos 30 °C, reduzem a sua sobrevivência mas para germinarem bem, se adequa a faixa do 6° a 30 °C, sendo a temperatura ótima em torno entorno 10 °C (ABREU, 2014).

Os escleródios permanecem no solo em estado de dormência até que as condições se encontrem favoráveis, para que ocorra tanto a germinação do micélio (miceliogênica) quanto à germinação de estipes e apotécios (carpogênica) (BARDIN; HUANG, 2007; HUANG, 1980). Na germinação miceliogênica, há a formação de micélio que coloniza os tecidos da parte basal da planta, e na germinação carpogênica, há a formação de apotécios que liberam ascósporos, que são responsáveis pela infecção da parte aérea (ABDULLAH, 2008).

Segundo Crato (2013), o tipo de germinação que acontece é determinado por vários fatores, entre eles as condições ambientais (especialmente temperatura e umidade), e a quantidade de nutrientes disponíveis no ambiente ao escleródio.

Na germinação miceliogênica, há a produção de hifas hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas, com origem a partir de microporos presentes no escleródio (BOLTON et al., 2006). A infecção por micélio se dá primeiramente pela colonização da matéria orgânica pelas hifas que, ao encontrar a planta hospedeira

propaga-se em tecidos senescentes, invadindo posteriormente os tecidos jovens e suculentos, fazendo com que as células parasitadas entrem em colapso (PURDY, 1979; AGRIOS, 2005) e, após a colonização, leva à planta a morte (*damping off*). Os focos secundários ocorrem através do contato desta com plantas vizinhas sadias (LUMSDEN; DOW, 1973; GUIMARÃES; STOTZ, 2004;).

Em algumas culturas como girassol e alguns vegetais o micélio pode infectar diretamente os tecidos radiculares suscetíveis (BOLTON et al., 2006). Em culturas como girassol e cenoura a germinação miceliogênica é importante no desenvolvimento da doença, onde a infecção ocorre comumente através das raízes, progredindo para dentro da haste (BARDIN; HUANG, 2007).

Diversos são os trabalhos que relatam a influência das condições ambientais na germinação carpogênica. Segundo Mila e Yang (2008) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas e variações no potencial de água no solo, constataram que aos 20 °C e saturação constante a taxa de germinação carpogênica manteve-se entre 25 e 45%. No entanto, ao avaliarem as variáveis do meio físico separadamente, constatou-se que a maior germinação ocorreu no intervalo entre 16 °C e 24 °C. Segundo Crato (2013), as condições ótimas para a produção dos apotécios são de 10 a 14 dias, com potencial matricial de água do solo de 250 kPa e temperaturas variando entre 15 e 18 °C, podendo ser inibido por temperaturas superiores a 20 °C. Constata-se então que a umidade do solo como fator limitante da produção de apotécios, tem-se que em solo sob constante saturação verificou-se maior germinação dos escleródios e formação de apotécios (BERUSKI, 2013).

O início da germinação carpogênica ocorre com o desenvolvimento do fungo na região da medula (GÖRGEN, 2009). As células fúngicas crescem, formando primórdios que rompem a casca do escleródio (GÖRGEN, 2009), continuam crescendo como ramificações em forma de tubo, os estipes, que quando são expostos à luz ultravioleta se diferenciam em apotécios, corpos de frutificação com formato de taça (CRATO, 2013). A ponta do estipe se expande formando o himênio (CRATO, 2013), no qual se desenvolvem as ascas onde ocorre a recombinação sexual, produzindo oito ascósporos em cada (DALLA PRIA; SILVA, 2010) sendo hialinos, elipsoides e binucleados (BOLTON et al., 2006).

Cada escleródio pode produzir mais de 20 apotécios, quanto maior o escleródio maior é a quantidade estruturas produzidas (BEDI, 1963 citado por

BRUSTOLIN, 2012). O himênio é formado por milhares de ascos e no período de 5 a 10 dias são liberados milhões de ascósporos (STEADMAN, 1983; PAULA JUNIOR et al., 2006), os quais são ejetados numa nuvem visível (REIS et al., 2011a), sendo disseminados pela ação do vento ou por abelhas, por longas distancias, e podem sobreviver por até duas semanas em campo, causando infecções primárias (BOLTON et al., 2006). A liberação pode ocorrer tanto de dia quanto de noite, decaindo quando a umidade relativa chega a 65 a 70% (CLARKSON et al., 2003).

Não há fase assexuada do fungo, mas há a formação de microconídios oriundo de hifas ou apotécio, entretanto não ocorre a sua germinação, sendo assim o seu papel na biologia do patógeno desconhecido (BOLTON et al., 2006).

Os ascósporos são providos de mucilagem que auxilia na fixação no tecido vegetal, são depositados por impacto ou através da sedimentação sobre os tecidos suscetíveis (BRUSTOLIN, 2012), infectando a partir de ferimentos e aberturas naturais (PURDY, 1979). Para que ocorra a sua germinação é necessária à presença de água livre e uma fonte exógena de nutrientes, que são oriundas de tecidos senescentes e/ou necróticos (BOLTON et al., 2006), e necessitam de 48 a 72 horas de umidade para a ocorrência da infecção (LUMSDEN, 1979).

Quando o ascósporo entra em contato com o tecido saudável do hospedeiro, este germina e emite o apressório. A penetração pode ocorrer de duas maneiras. A primeira ocorre pela da cutícula do hospedeiro de forma mecânica por meio da “hifa de infecção” ou “peg de infecção” e, a segunda através das aberturas naturais, como por exemplo, as aberturas estomáticas (ABAWI; GROGAN, 1975). Após a penetração, o patógeno coloniza o tecido vegetal, se desenvolvendo no interior das células com o crescimento das hifas, acarretando na morte celular e, posteriormente, levando a desorganização dos tecidos do hospedeiro, em decorrência dos processos enzimáticos fúngicos que afetam a lamela média e causam degradação da parede celular (STEADMAN, 1983).

Os ascósporos são responsáveis pelas infecções na parte aérea das plantas, especialmente aquelas que acometem órgãos florais, axilas de folhas e de ramos laterais. A ocorrência do mofo branco esta relacionada ao período de florescimento das plantas hospedeiras, onde as flores se tornam substrato para a sua germinação (VIEIRA, 1994). Normalmente, os ascósporos colonizam primeiro o material vegetal morto ou senescente, utilizando-o como fonte nutritiva. Flores senescentes são importantes fontes primárias de nutrientes, onde muitas vezes se encontram caídas

sobre folhas, pecíolos ou caules (CRATO, 2013). Em suma, os tecidos vegetais jovens são responsáveis pela nutrição das hifas originárias dos ascósporos que penetram no hospedeiro, seguida de colonização dos tecidos da planta infectada (SUTTON; DEVERALL, 1983).

O micélio do fungo produz ácido oxálico, que facilita a invasão dos tecidos pelas hifas, o qual reduz o pH de 6,8 para 4,0 (BRUSTOLIN, 2012). O pH ácido favorece a ação de enzimas que degradam a parede celular, além disso remove os íons de cálcio vinculados as pectinas, expondo as células hospedeiras as enzimas catabólicas do fungo (GONÇALVES, 2012). Também causa perturbação nas células-guarda dos estômatos, que regulam o processo osmótico, interferindo na produção do hormônio ABA, induzindo a abertura estomática. Atua no mecanismo de resistência das plantas, desativando-o por meio da liberação de oxigênio e peróxido de hidrogênio (CESSNA, 2000).

Há relatos na literatura da existência de mutantes de *Sclerotinia sclerotiorum* que são incapazes de formar ácido oxálico e que também são incapazes de formar escleródios *in vitro*, perdendo a sua capacidade fitopatogênica (GODOY et al., 1990; DICKMAN; MITRA, 1992). A ação do ácido oxálico na patogenicidade de determinados fungos necrotróficos é bem conhecida e desempenha papéis diversos e complexos no processo de infecção (DUTTON; EVANS, 1996).

Nos tecidos infectados da planta há o desenvolvimento da hifa em vesícula localizada entre a cutícula e a epiderme, e internamente no córtex da planta (LUMSDEN; DOW, 1973). Após a colonização do tecido a massa de hifas começa a emergir dos estômatos ou das aberturas naturais da planta, formando uma massa micelial semelhante a um floco de algodão (ABAWI; GROGAN, 1975; PURDY, 1979).

Ao encontrar condições ambientais favoráveis, o fungo cresce rapidamente, invadindo os tecidos do hospedeiro, ocasionando podridão aquosa, na qual se desenvolve um micélio branco cotonoso sobre os tecidos infectados. Com o crescimento micelial, estruturas pequenas e compactas são formadas na superfície, os escleródios. Com a evolução da doença, um grande número de escleródios que são formados, na medida em que o hospedeiro se decompõe. Quando a cultura é colhida, muitos dos escleródios formados caem no solo com a colheita mecânica ou

também pode ocorrer de forma natural, tornando-se fonte de inóculo para as culturas subsequentes, além de contribuir para o aumento do banco de escleródios no solo.

Para que ocorra novamente a germinação dos escleródios é necessária que ocorra a superação da dormência, que geralmente não ocorre na mesma estação na qual são produzidos. Segundo Van Der Plank (1963), desta forma a disseminação secundária do inóculo é restringida e o progresso da doença ocorre apenas pelo contato dos tecidos infectados com os sadios e, conseqüentemente, do ponto de vista epidemiológico, o mofo branco é classificado como uma doença de juro simples.

Segundo Harikrihsnan e Del Rio (2008), o mofo branco é uma doença endêmica, ou seja, esta sempre presente na área de cultivo, e caracteriza por não estar em expansão, apresentando balanço neutro entre os processos de infecção e remoção do tecido lesionado.

*Sclerotinia sclerotiorum* é disseminado no ambiente de diferentes formas, através escleródios, ascósporos e micélio dormente localizado no interior e exterior das sementes, que podem estar aderidos em implementos e maquinários agrícolas, ou em solos infestados, plantas daninhas e tigueras suscetíveis, além de restos culturais ou também pela ação do vento (JULIATTI et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; SAHARAN; MEHTA, 2008). No entanto, outra forma de disseminação é através de animais, que são alimentados com resíduos vegetais contendo escleródios, que não são inativados durante a digestão, e que podem ser disseminados pelas fezes (KORA et al., 2003).

As sementes são consideradas o veículo mais eficiente de disseminação do patógeno, pois as mesmas constituem-se em um abrigo seguro à sobrevivência e é um método eficiente de transporte em distâncias consideráveis (DHINGRA, 2005). Assim, a presença de sementes infectadas, além de contribuir com a disseminação do fungo em novas áreas, assume papel importante no aumento da intensidade da doença, quando ocorre a transmissão do patógeno da semente para a planta, originando plantas doentes (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Durante a colheita em áreas infestadas pelo patógeno, os escleródios são misturados às sementes e se o beneficiamento não for adequado estas estruturas poderão infectar um novo campo (CUNHA, 2010).

Outra forma de disseminação se dá pela ação do vento, onde os ascósporos são ejetados das ascas e levados a plantas e lavouras vizinhas (ATHOW, 1973). De

acordo com Steadman (1983), esses esporos são disseminados pelo vento podem alcançar distâncias de até 100 m do local de origem.

### 2.3 Sintomatologia

Como o fungo *S. sclerotiorum* possui uma grande gama de plantas hospedeiras, não há sintoma específico, contudo, os sinais são autênticos do ataque do patógeno em qualquer espécie hospedeira, com a formação de micélio cotonoso, de coloração branca, podendo ter ou não a presença de escleródios. A doença conhecida como mofo branco ou podridão branca recebe estes nomes em função dos sintomas e sinais externos. O patógeno pode atacar a planta em qualquer estágio fisiológico, porém os maiores danos ocorrem no florescimento e na formação das vagens (CASSETARI NETO et al., 2010).

O fungo *S. sclerotiorum* causa uma série de sintomas, que vão de podridões em pré e pós-emergência, *damping-off*, murchas de folhas, podridão de colo, raiz e coroa, evoluindo até a necrose total dos tecidos (KIMATI et al., 2005), ocasionando perdas desde os estádios iniciais de diversas culturas.

Os primeiros sintomas que surgem são lesões aquosas, de onde crescem as hifas, formando abundante micélio (BOLTON et al., 2006). Com o avanço da colonização do tecido vegetal, as lesões inicialmente são encharcadas tornam-se secas, de aspecto descolorido e normalmente esbranquiçado (GÖRGEN, 2009). O sintoma de podridão é caracterizado pela degeneração da medula das partes infectadas da planta, levando à murcha (CASSETARI NETO et al., 2010). Os ramos doentes se tornam desbotados e secos e as cavidades internas são preenchidas com micélio e escleródios do fungo (REIS et al., 2007).

Os tecidos dos ramos e hastes são colonizados, e com o aumento da necrose a planta apodrece, podendo vir a morrer, transmitindo assim a doença para as plantas vizinhas (REIS et al., 2007). Segundo os mesmos autores, os ramos doentes se tornam desbotados, adquirem coloração esbranquiçados, e secos.

Segundo Reis et al. (2007) frutos, tubérculos e raízes tuberosas atacados pelo patógeno apodrecem, ocorre a degeneração dos tecidos colonizados, podem desenvolver escleródios em sua superfície. Já em sementes infectadas, elas se

tornam reduzidas, sem brilho, com descoloração, enrugadas e com baixo peso, podendo a vir a apodrecer e perde a capacidade de germinação (CANTERI et al., 1999; PAULA JUNIOR et al., 2010). Aquelas que germinam resultam em plântulas doentes ou morrem logo em seguida, caracterizando assim o sintoma de tombamento (PAULA JUNIOR et al., 2010).

Já em alface, há o aparecimento de podridões aquosas, nas folhas próximas à superfície do solo (início da infecção), que atingem os pecíolos e causam a morte das folhas, que murçam e prostram-se sobre o solo, também ocorre a perda da chamada “saia”, onde as folhas basais entram em colapso e há a formação escleródios no local (SILVA, 2013). Em tomate rasteiro, observa-se a formação de micélio cotonoso na base da planta e em hastes que entram em contato com o solo, que evolui para uma necrose, os tecidos que localizam acima dessa região murçam e secam, os frutos atacados degeneram em uma podridão mole (AGUIAR, 2011).

De acordo com Görge et al. (2010), a ausência de medidas de controle resulta no aparecimento da doença em reboleiras, com plantas murças e amareladas, que tende a aumentar de tamanho, até infectar toda área de cultivo.

## **2.4 Manejo da doença**

O manejo do mofo branco é extremamente difícil e requer a integração de varias medidas de controle, as quais não devem ser adotadas isoladamente, sendo assim é indispensável a adoção de práticas culturais em função da capacidade de sobrevivência do fungo no solo e das condições ambientais favoráveis à sua germinação (MEYER; CAMPOS, 2009; JULIATTI; JULIATTI, 2010).

Segundo Reis et al. (2011b), por isso deve-se considerar a utilização do Manejo Integrado de Doenças (MID), sendo definido de acordo com a NAS (National Academy of Science dos Estados Unidos, 1969) como a “utilização de todas as técnicas disponíveis dentro de um programa unificado, de tal modo a manter a população de organismos nocivos abaixo do Limiar de Dano Econômico (LDE) e a minimizar os efeitos colaterais ao meio ambiente “. O MID satisfaz as exigências técnicas de sustentabilidade da agricultura (REIS et al., 2011b). De acordo com Pereira e Pinheiro (2012), essa nova filosofia surgiu após o aparecimento de frequentes contaminações e desequilíbrios ambientais, além da presença de

resíduos e intoxicação dos aplicadores, em consequência do uso indiscriminado de defensivos agrícolas.

A severidade da doença nas diferentes culturas hospedeiras é diretamente proporcional à densidade do inóculo do patógeno presente no solo, ou seja, para que haja o controle do mofo branco, deve-se reduzir a quantidade de escleródios presentes no solo. Deve-se também evitar a formação de apotécios e, conseqüentemente, a liberação dos ascósporos, assim reduzindo a formação de novas estruturas de resistência através do controle preventivo da doença (GÖRGEN et al., 2010).

Alguma das dificuldades de controle dessa doença pode ser devido à permanência de escleródios viáveis por longo período de tempo no solo, a falta de controle químico eficaz, juntamente com a alta suscetibilidade dos hospedeiros (BOTELHO, 2011).

#### **2.4.1 Medidas de Controle baseadas na exclusão**

O mofo branco é uma doença de difícil controle, devido, à formação de estruturas de resistência, os escleródios, que garantem a sobrevivência do patógeno por um longo período de tempo no solo. Diante disso, a principal medida de controle é a prevenção, a fim de se evitar a entrada do patógeno em áreas onde não há histórico de ocorrência da doença, pois uma vez presente, é impossível erradicá-lo (ALMEIDA et al., 2005; PAULA JÚNIOR et al., 2010; PEREIRA et al., 2013).

As medidas de controle baseadas na exclusão preconizam a prevenção da entrada e estabelecimento do patógeno em uma área isenta, sendo feita através de medidas quarentenárias, consolidadas em legislações fitossanitárias promulgadas por órgãos governamentais nacionais e/ou internacionais (KIMATI; BERGAMIN FILHO, 1995). Estes autores citam que a eficiência deste tipo de controle está relacionada com a capacidade de disseminação do patógeno e com a distância em relação à área livre da doença.

Dentre as medidas de exclusão, está a utilização de sementes sadias e de certificadas, com procedência conhecida e com certificado fitossanitário de origem, é um aspecto fundamental no manejo da doença, a fim de se evitar introdução do

patógeno na área (LEITE, 2005; CAMARGO, 2013). No entanto, somente a utilização de sementes certificadas não garante que as mesmas se apresentem livres do patógeno (PAULA JUNIOR et al., 2010), por isso é necessário se fazer a análise sanitária das sementes, antes de ser feita a semeadura (implantação da cultura a campo). Uma das recomendações de controle mais importante também é evitar a utilização de sementes com escleródios (CAMARGO, 2013).

O tratamento de sementes é um eficiente método para controle do patógeno, é uma tecnologia de baixo custo, pouco risco ambiental e, em geral, apresenta efeito significativo na produtividade (MENTEN et al., 2005), além de reduzir a possibilidade de transmissão do fungo por meio de micélio dormente (LEITE, 2005). Em trabalhos realizados por Rashid e Swanson (2008), compararam os ingredientes ativos tiofanato metílico, vinclozolin, azoxistrobina e fludioxonil, e verificaram redução na incidência da infecção inicial por *S. aclerotiorum*, evitando assim perdas no rendimento. Já Mueller et al. (1999) avaliaram o crescimento micelial do patógeno causador do mofo branco em sementes tratadas com fludioxonil, captana + PCNB + tiabendazol, carboxina +tiram e tiabendazol + tiram inibiram o crescimento micelial, já os tratamentos tiabendazol, tiram e tiabendazol + tiram reduziram cerca de 90%. Os mesmos autores também verificaram a redução na formação de estruturas de resistência nas sementes que foram tratadas com fludioxonil, tiram e captana + PCNB + tiabendazol.

De acordo com Cunha (2010), a utilização de análise sanitária juntamente com o tratamento de sementes, são ferramentas que evitam a entrada do patógeno ou então reduz a quantidade de inoculo inicial, além contribuir melhorando a produtividade e o controle da doença. Com isso, há uma redução na quantidade de fungicidas necessária para controla-la na lavoura, proporcionando uma economia ao produtor, e benefício para o meio ambiente (NASSER et al., 1999).

Também é importante se fazer a limpeza minuciosa de equipamentos agrícolas, principalmente se foram utilizados em áreas contaminadas, a fim de se evitar a introdução do patógeno em novas áreas, sem a presença do patógeno (PEREIRA et al.,2013).

### 2.4.2 Controle químico

Além do tratamento de sementes, a aplicação de fungicidas na parte aérea auxilia no controle do mofo branco (CAMARGO, 2013). No entanto, a redução da incidência proporcionada pela utilização de fungicidas varia de 0 a 60%, ou seja, não é possível o controle absoluto da doença (ESKER et al., 2011). Sendo assim, o controle químico não deve ser utilizado como único método de controle, e sim em conjunto com outras ferramentas de controle, visando um manejo integrado.

Segundo Costa e Costa (1998), a densidade do inóculo de *S. sclerotiorum* no solo, influencia diretamente a eficiência do controle químico. No entanto, outros fatores também influenciam na eficácia desse método de controle como princípio ativo utilizado, o número de aplicações, o momento da aplicação e a tecnologia utilizada (CAMPOS et al., 2008). Para se haja a máxima eficiência do produto, a aplicação deve ser feita inicialmente no início da floração, sendo que a sua eficácia decai com aparecimento dos primeiros sintomas (ESKER et al., 2011). A cobertura deve ser feita de tal modo a atingir as partes mais baixas da planta, onde se encontra o local inicial de infecção (CAMARGO, 2013). Também devem ser utilizadas gotas de tamanho médio e volume de calda maior, afim se obter melhores resultados (ESKER et al., 2011).

É recomendado realizar a aplicação de fungicidas preventivamente no início da floração até a queda das primeiras flores da cultura, concomitantemente com a presença de apotécios no solo (BRUSTOLIN, 2012). Vieira (1994) citou a importância das flores na epidemiologia da doença, sendo chave para o manejo do controle químico.

Somente para a cultura da soja há o registro de 14 produtos comerciais para o controle químico do mofo branco, tendo como ingredientes ativos fluazinam, carbendazim, tiofanato metílico, cloreto benzalcônico e procimidona (CAMARGO, 2013). Cassetari Neto et al. (2010) encontraram resultados satisfatórios a nível experimental dos ingredientes ativos procimidona, iprodiona, fluazinam e fluopyram. Segundo Ribeiro (2012) afirmou que os melhores resultados de controle com fungicidas pertencentes aos grupos químicos dos dicarboximidas, benzimidazóis e fenilpirimidinamida.

A forma de aplicação do fungicida, também é importante para o controle efetivo da doença, onde a aplicação de fungicidas via água de irrigação e na fungigação, proporciona uma excelente uniformidade na sua distribuição (AGUIAR, 2011).

Apesar de ser o método de controle mais utilizado, o controle químico é pouco eficiente, porque o período inicial de infecção do patógeno ocorre quando a planta se encontra na fase reprodutiva (CUNHA, 2010). Nesse estágio, as linhas de plantio estão cobertas pelo dossel das plantas e as folhas e ramos dificultam a distribuição do fungicida, dificultando atingir os locais de infecção, que se encontram próximos ao solo, juntamente com as estruturas de resistência presentes sobre o mesmo (GÖRGEN, 2009).

Segundo Camargo (2013) e Paula Junior et al. (2010), alguns herbicidas podem apresentar efeitos benéficos no controle do mofo branco, alguns ingredientes ativos induzem a planta produzir compostos antimicrobianos, outros estimulam a germinação de escleródios, possibilitando a sua utilização em culturas não hospedeiras acarretando uma diminuição do inóculo na área, também pode causar o efeito contrário, inibindo a germinação carpogênica, formando apotécios anormais ou que não produzem esporos sexuais.

Além disso, esse tipo de controle causa impactos negativos ao meio ambiente, contaminando o solo e a água, além de selecionar isolados resistentes aos princípios ativos (OLIVEIRA, 2007). Por isso, é necessário se fazer o manejo da resistência do fungo *S. sclerotiorum*, por esse ser altamente adaptável, onde um manejo inadequado dos ingredientes ativos no controle da doença pode induzir a seleção de isolados resistentes. Há relatos na literatura da perda ou redução da sensibilidade de isolados de *S. sclerotiorum* ao benomil (MULLER et al., 2002). Adicionalmente, o uso de fungicidas para o controle de mofo branco aumenta os custos de produção, reduzindo o lucro do produtor.

### **2.4.3 Controle Biológico**

De acordo com Cook e Baker (1983), o controle biológico é definido como a redução da densidade do inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um determinado patógeno, por um ou mais organismos, de forma

natural ou através da manipulação do ambiente ou do hospedeiro, ou pela introdução massal de um ou mais antagonistas.

É uma alternativa viável a utilização do controle químico, por apresentar especificidade ao alvo, utiliza diferentes meios para atingi-lo, restringindo as chances de selecionar linhagens resistentes (MORANDI; BETIOL, 2009), não contamina os alimentos e o ambiente. O uso de microrganismos antagônicos a fitopatógenos é uma saída sustentável para o manejo de doenças na agricultura (RIBEIRO, 2012). Dentro do manejo integrado do mofo branco, esta pratica vem ganhando espaço com a utilização de microrganismos antagonistas (ZANCAN et al., 2012), que reduzem o potencial de inóculo parasitando escleródios e apotécios.

Conforme Pomella e Ribeiro (2009) afirmam que a utilização do controle biológico, reduz o número de aplicações de fungicidas, podendo até mesmo eliminar essa prática, dependendo das condições ambientais, da severidade e do manejo que vem sendo adotado.

Entre os microrganismos de controle biológico, se destaca os fungos do gênero *Trichoderma*, que possuem mecanismos de ação que permite atuar como agente de biocontrole de fitopatógenos, além de promover o crescimento de plantas e atuar como indutores de resistência (MOHMED; HAGGAG, 2006). Benítez et al. (2004) demonstraram que alguns isolados de *Trichoderma harzianum*, possuem a capacidade de estimular o crescimento de plantas de tomate, fumo e algodão, por estimular a produção de fitohormônios ou substancias estimuladores do crescimento.

Alguns fungos do gênero *Trichoderma*, são capazes de colonizar e destruir estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos como os escleródios (KIM; KNUDSEN, 2008), atuam através da antibiose, microparasitismo e competição, além de diminuir as chances de selecionar linhagens resistentes (FRAVEL, 2005).

Contudo, a utilização de antagonistas exige vários cuidados para que se atinja o sucesso no controle, como aplicações em condições ambientais favoráveis, alta umidade relativa e clima ameno, além da utilização de cepas fúngicas com alta competitividade e da aplicação de esporos nas concentrações suficientes. No controle de *S. sclerotiorum* a aplicação de antagonistas deve ser feita antes da germinação dos escleródios, ou seja, quando se encontra em repouso no solo, por

estar mais vulnerável ao ataque, sendo recomendado a aplicação em 100% da área infectada com o patógeno (AGUIAR, 2011).

### **2.4.3 Outros métodos de controle**

O controle da doença está concentrado em práticas agronômicas como o plantio de cultivares que não acamam maior espaçamento entrelinhas, menor população de plantas, plantio direto, rotação com culturas não hospedeiras, além da aplicação de fungicidas e o manejo da irrigação.

A resistência genética do hospedeiro é complexa e com baixa herdabilidade, e é restrita a genótipos que apresentam resistência parcial (KIM; DIERS, 2000; ARAHNA et al., 2001). A resistência parcial pode ser atribuída à resistência fisiológica, como características da planta que proporcionam condições desfavoráveis ao desenvolvimento do patógeno (CUNHA, 2010). Entre essas características se encontram o acamamento, arquitetura do dossel, altura da planta, período de floração e maturação relativa (KIM; DIERS, 2000).

A utilização de métodos culturais visam evitar microclima favorável, através da utilização de plantios com espaçamento entrelinhas maiores, juntamente com a utilização de plantas com porte mais ereto, o que propicia maior arejamento (PAULA JUNIOR et al., 2006), impedindo a manutenção da umidade adequada, tanto do dossel quanto do solo. Conforme Saindon et al. (1993) e Schwartz et al. (1978), a diminuição da umidade na superfície do solo interfere diretamente na formação de apotécios e, conseqüentemente, na ejeção dos ascósporos. Plantas de porte mais ereto causam menor intensidade da doença por proporcionar uma menor condição ideal ao patógeno e ajuda reduz a infecção de plantas vizinhas (PAULA JUNIOR et al., 2006).

A utilização de rotação de culturas, principalmente com plantas pertencentes à família Poaceae (Gramineae), por não serem suscetíveis ao patógeno, diminui o potencial de inóculo. Para que sejam obtidos resultados satisfatórios, a rotação de culturas deve envolver intervalos de tempo maiores entre espécies hospedeiras (COSTA; RAVA, 2003), onde as culturas não hospedeiras, permite que os escleródios germinem, formando apotécios e ascósporos, que não conseguem causar infecção nas plantas, ocorrendo assim redução na quantidade de inóculo presente no solo (PAULA JUNIOR, 2010). As práticas de preparo do solo, também

contribuem para a redução do número de escleródios no solo e a sua capacidade de germinação (SCHWARTZ et al., 2012).

A utilização de palhada formada pela deposição de material vegetal sobre o solo sendo importante ferramenta para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, a qual atua como barreira física a germinação carpogênica. Outra função importante da palhada, é que durante o processo de decomposição há a liberação de substâncias alelopáticas que atuam sobre as sementes de plantas invasoras (KLUTHCOUSKI et al., 2004), as quais também são hospedeiras do patógeno.

Com o conhecimento da gama de plantas hospedeiras deste fungo é possível orientar o manejo da doença, pois ao se dar ênfase às culturas não hospedeiras pode-se programar rotações de culturas mais adequadas, destinadas a reduzir a concentração de escleródios em solos infestados (LOBO JUNIOR, 2014).

A prática agrícola da irrigação, pode favorecer a germinação carpogênica e a produção dos apotécios, por fornecer umidade ao ambiente e ao solo, conseqüentemente reduzindo a temperatura do ar e do solo. De acordo com Twengström et al. (1998), cerca de 25 a 30 dias após o início da aplicação da água de irrigação, há a formação de apotécios e a medida em que se aumenta a quantidade água a germinação carpogênica se eleva.

Em áreas com histórico da presença do patógeno, onde é utilizado sistema de irrigação, a aplicação de água deve ser feita por meio de regas pesadas e menos frequentes, reduzindo a umidade do solo, assim, diminuindo as condições ideais para o desenvolvimento do patógeno, e quando possível à irrigação deve ser orientada por tensiômetros, que indicam o momento certo para aplicação da lâmina de água (PAULA JUNIOR et al., 2006; PEREIRA et al., 2013).

#### **2.4.4 Controle alternativo com óleos essenciais**

Métodos de controle alternativo de fitopatógenos estão ganhando importância nos sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de agrotóxicos que vem sendo desenvolvidos para as diferentes culturas. A fitoterapia é uma forma de controle de agentes etiológicos através da utilização dos metabólitos

secundários produzidos pelas plantas (GOVINDACHARI et al. 2000; SOUZA et al. 2002).

Segundo Matos (1997), a exploração de metabólitos secundários de plantas, tem se tornado uma alternativa viável no controle de patógenos de plantas, que possuem potencial para substituir a utilização de produtos químicos, uma vez que apresentam propriedades fungicidas e/ou fungitóxicas. Esses compostos possuem menor toxicidade tanto ao homem quanto ao meio ambiente, tem menor custo de produção e são mais eficazes contra a resistência dos microrganismos (STANGARLIN et al., 1999; DE BONA et al., 2014).

O Brasil, juntamente com a Índia, China e Indonésia está entre os quatro maiores produtores de óleos essenciais do mundo, e se encontra nessa posição devido aos óleos essenciais cítricos que são subprodutos da indústria do suco (GOMES, 2011). Isso coloca em evidencia o potencial de aproveitamento dos recursos naturais que o país possui (MAIA et al., 2015). Segundo Costa et al. (2010), a família Rutaceae possui 156 gêneros e 1800 espécies distribuídas por todo mundo. Os membros dessa família são fortemente aromáticos, devido a presença de óleos essenciais (LOPES, 2013).

A ISO (International Standard Organization) define óleos essenciais como os compostos obtidos de partes de plantas, por meio de destilação por arraste com vapor d'água, ou também por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Também são conhecidos como óleos voláteis, etéreos ou essenciais (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Óleos essenciais são compostos voláteis com baixo peso molecular, produzidos pelas plantas para sua sobrevivência (MAIA et al., 2015), com aroma e sabor característico e que em temperatura ambiente ficam líquidos, são consideradas moléculas lipofílicas, ou seja, insolúveis em água, são instáveis na presença de luz, calor, umidade, ar e metais (SIMÕES et al., 2007; GOMES, 2011). Estes compostos são sintetizados e armazenados em estruturas epidérmicas ou mesofílicas, presentes em rizomas, bulbos, folhas, flores, cascas dos frutos e os frutos, que são sintetizados por glândulas secretoras e tricomas glandulares (GOMES, 2011).

De acordo com Bakkali et al. (2008), são conhecidos por sua ação antisséptica, ou seja, bactericida, virucida, fungicida, além de possuir propriedades medicinais. Na natureza, os óleos essenciais desempenham papel importante na proteção de plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticida

e também contra herbívoros reduzindo sua palatabilidade, além de atrair algumas espécies de insetos, que atuam na dispersão do pólen e sementes.

Segundo Silva (2007) a toxicidade que alguns óleos essenciais possuem, está relacionada à alta complexidade de sua composição química, onde os vários componentes químicos presentes podem atuar em sinergismo, apresentando ação fungicida e fungistática.

As maiorias dos óleos essenciais possuem algum grau de atividade antimicrobiana, e essa atividade é atribuída à ação das substâncias presentes em sua composição como os compostos fenólicos, monoterpenos e terpenóides (GILLES et al., 2010; MAIA et al., 2015). É amplamente conhecido que os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana, sendo esta bem esclarecida na literatura, entretanto, o mecanismo de ação antimicrobiana, ainda não se encontra completamente entendido (COSTA et al., 2000). O que se sabe é que os compostos aromáticos e fenólicos atuam diretamente sobre a membrana citoplasmática, causando alterações estruturais e funcionais (HOLLEY; PATEL, 2005).

A ação antimicrobiana dos óleos e extratos está ligada diretamente a sua característica lipofílica, permitindo para os mesmos a interação destes com a membrana celular tornando-a permeável, causando assim modificações estruturais (BAKKALI et al., 2008). Rasooli et al. (2006) verificaram que o fungo *Aspergillus niger* apresentou alterações morfológicas nas hifas, interrupção e destruição das membranas plasmáticas e mitocondriais com a ação dos óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock*. Costa et al. (2011) avaliando o efeito do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre as hifas de *Rhizoctonia solani*, observaram diferentes alterações morfológicas, tais como a presença de vacúolos, desorganização dos conteúdos celulares, diminuição na nitidez da parede celular, intensa fragmentação e menor turgência das hifas.

Conforme Sikkema et al. (1994) por serem lipofílicos os óleos se acumulam na bicamada lipídica, determinando assim a permeabilidade dessa estrutura. A característica hidrofóbica causa alteração na estrutura do envelope celular, e os compostos fenólicos, como timol, carvacrol e eugenol diminuem a fluidez e alteram o perfil lipídico da membrana celular bacteriana (PASQUA et al., 2007).

Diversos trabalhos com óleos essenciais tem mostrado o seu potencial no controle de bactérias (SILVA et al., 2010; DEMUNER et al., 2011; NASCIMENTO et

al., 2011) e fungos fitopatogênico, a inibição do desenvolvimento dos mesmos pode ocorrer de duas formas, pela ação direta inibindo o crescimento micelial e a germinação dos esporos, quando forma indireta pela indução de resistência a diversos patógenos (DONLAPORN; SUNTORNSUK, 2010; DEUS et al., 2011; PERINI et al., 2011).

Pesquisas vêm mostrando a eficiência de diferentes óleos essenciais no controle de microrganismos, entre eles estão os óleos de capim-limão, eucalipto e menta no controle do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (CARNELOSSI et al., 2009). A utilização de óleo de endro no controle de fungos que atacam o tomate cereja (TIAN et al., 2011) e o de laranja na redução do crescimento micelial e na germinação de esporos de *Aspergillus niger* (SHARMA; TRIPATHI, 2008). Um dos exemplos de plantas que também possuem potencial de uso no controle de fitopatógenos são o Nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) e Karanja (*Pongamia glabra*), comumente utilizadas no controle de doenças e pragas agrícolas (GARCIA et al., 2012).

Em trabalhos desenvolvidos com extratos e óleos essenciais obtidos de plantas medicinais da flora nacional, foi verificado potencial para o controle de fitopatógenos, onde a ação fungitóxica inibiu o crescimento micelial e também a esporulação, além de induzir a produção de fitoalexinas (COOK; BAKER, 1983). Segundo Purkayastha (1995) as fitoalexinas são oriundas do metabolismo secundário, com ação antimicrobiana, de baixo peso molecular, que são produzidas pelas plantas em respostas aos estresses físicos, químicos e biológicos.

Celoto et al. (2008) e Maia et al., (2015) consideram que a diversidade dessas substâncias poderiam possibilitar a utilização direta pelo produtor, através do cultivo da planta que produz compostos secundários com propriedades antifúngicas, para o preparo e posterior aplicação de extratos, com isso diminui o custo do controle do patógeno, sendo uma alternativa vantajosa para pequenos produtores.

Silva et al. (2008), ao testarem os extratos de folhas, do cerne e do córtex da raiz e do caule da “fruta-do-conde”, verificaram que o extrato hexânico do cerne do caule da planta foi ativo contra o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*, entretanto, os demais extratos testados não apresentaram o mesmo efeito. Os autores sugerem que o princípio ativo contra o patógeno deve estar presente em maior concentração no cerne do caule do que nas demais partes da planta.

Garcia e colaboradores (2012) estudaram o efeito de óleos e extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Foram estudados os extratos vegetais de *Schinus molle* L. (aroeirinha), *Ageratum conyzoides* L. (mentrasto), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca), *Artemisia absinthium* L. (losna), *Syzygium cumini* L. (jambolão), *Ruta graveolens* L. (arruda), *Manihot esculenta* Crantz (mandioca), *Melia azedarach* L. (Santa Bárbara) e *Piper aduncum* L. (pimenta longa) na concentração de 30%. Onde foi verificado que os extratos de Santa Barbara, mentrasto e arruda inibiram em 25% o crescimento micelial, já o extrato de pimenta longa obteve o melhor resultado inibindo 43%. Os autores também estudaram o efeito da associação entre o nim indiano e o óleo Karanja sobre o desenvolvimento micelial de *S. sclerotiorum*, onde a eficiência na redução do crescimento micelial foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações de nim indiano e Karanja, sendo a concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de nim com 1/3 de Karanja, inibiu 63,10%.

Pansera et al. (2012) estudaram a ação dos óleos essenciais e extratos vegetais (hidroetanólico, etanólico e infusão) de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), aroeira (*Schinus molle*), aroeira brava (*Schinus terebinthifolius*), salvia (*Salvia officinalis*) e carqueja (*Bacharis trimera*) no desenvolvimento micelial de *S. sclerotiorum*. Onde foi verificado que óleo essencial de capim-limão inibiu totalmente o crescimento micelial do patógeno em todas as concentrações testadas, e para os óleos essenciais de salvia e carqueja, inibiram em 100% o crescimento micelial nas concentrações de 0,15% e 0,20%. Já Soylyu et al. (2007), constataram que os óleos oriundos de orégano (*Origanum syriacum* var *bevanii*) e funcho (*Foeniculum vulgare*) apresentaram inibição total do crescimento micelial do patógeno *S. sclerotiorum*, a partir das concentrações de 3,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 1,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

O potencial antifúngico do óleo essencial da casca de laranja (OECL) foi observado por Rentschler (2014), onde o extrato de alho e OECL apresentaram potencial para o controle de *Alternaria alternata* e *Alternaria dauci*, uma vez na que na menor concentração estudada (10%) reduziram a incidência desses fungos em sementes de cenoura.

O limoneno é o constituinte majoritário do óleo essencial da casca de laranja, o qual possui atividade antimicrobiana sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Alternaria alternata* (GUIMARÃES et al., 2011). Segundo Maróstica Júnior e Pastore (2007) afirmam que o efeito inibidor do limoneno em microrganismos, é creditado a

diminuição da velocidade do processo fosforilação oxidativa, aumentando a flacidez das membranas dos fungos filamentosos, o que leva a permeabilidade inespecífica, perda da integridade celular, decréscimo da matéria seca e inativação da energia metabólica.

Rodrigues e colaboradores (2007) estudaram o efeito do extrato bruto aquoso de gengibre (EBA) sobre o crescimento micelial e a produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. Foi observado que o EBA na concentração máxima (25%) utilizada, proporcionou uma inibição no crescimento de 92,5% e a inibição da produção escleródios não alcançou o valor 30%.

Stefanello et al. (2006) estudaram o efeito de extratos de plantas nativas do cerrado sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*, verificaram que extratos de *Tabebuia heptaphylla* e *Combretum laxum* apresentaram efeito supressor. Gavassoni et al. (2006) verificaram que extratos a base de aveia, trigo, ervilhaca e feijão, apresentaram redução da germinação dos escleródios. Da mesma forma, estudos realizados por Sharma e Basandrai (1997) com diferentes isolados de mofo branco oriundos da ervilha, grão-de-bico, couve-flor e rabanete, extratos foliares de plantas de nim reduziram a germinação carpogênica em condições laboratoriais.

Nos sistemas de produção alternativos são utilizados diversos produtos para o controle de pragas e doenças, para melhorar a nutrição plantas, além atuar como ativadores de mecanismos de resistência vegetal (LORENCETTI et al., 2015). No entanto, até o momento, não existem relatos da utilização do emprego de produtos comerciais à base de óleos essenciais sobre o patógeno causador do mofo branco. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial e a germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro, sob diferentes concentrações do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja.

## 5 REFERÊNCIAS

- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**. Saint Paul, v.65, n.3, p. 300 – 309, 1975.
- 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. 27 p. 1354-1359, 2008.
- ABREU, M.J. de. **Caracterização de isolados do agente casual do mofo branco do feijoeiro**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras.
- AGUIAR, R.A. de. Manejo do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* L.) em tomateiro industrial. 2011. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego, Academic Press, p.827, 2005.
- AGRIOS, G. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press. 4 ed. 1997.
- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A. A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZNDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres LTDA, 4. ed, v.2, 2005.
- ARAHANA, V.S.; GRAEF, G.L.; SPECHT, J.E.; STEADMAN, J.R.; ESKRIDGE, K.M. Identification of QTLs for resistance of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, v.41, p. 180-188, 2001.
- ATHOW, K.L. Fungal diseases. Soybeans: Improvement, production and uses. Madison, **American Society of Agronomy**, p. 459-489, 1973.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARDIN, S.D; HUANG, H.C. Research on biology and control of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, v.35, p. 21-24, 2007.

BEDI, K.S. The age and size of sclerotic of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary in relation to the formation of apothecia. **Journal of the Indian Botanical Society**, v. 42, p. 204-207, 1963.

BENÍTEZ, T. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona – Spain, v.7, 2004.

BERUSKI, G.C. **Incidência e severidade de mofo branco em soja cultivada sob diferentes densidades populacionais e espaçamentos**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Pathology**. v.16, p. 93–108, 1994.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 01-16, 2006.

BOTELHO, L. da S. **Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras.

BRUSTOLIN, R. **Produção de inóculo e sobrevivência de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2012. Tese (Doutorado) - Universidade de Passo Fundo.

CAMARGO, M.P. ***Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja: sobrevivência, efeito, germinação, tamanho da amostra para análise e eficiência *in vitro* de fungicidas**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

CAMPOS, H. D.; SILVA, L.H.C.P. ; SILVA, J.R.C.; MONTEIRO, F. . Effect of fungicides in the development of *Colletotrichum truncatum* in controlled conditions. In: **4 Top Ciência**, 2008, Heideberg - Germany. Top Ciência Basf. São Paulo: BASF the Chemical Company. 5. p. 1-2, 2008.

CANOVA, E. **Mofo branco em soja**. 2014. Disponível em <<http://clubephytus.com/content/details/20b5e1cf8694af7a3c1ba4a87f073021>>.

Acesso em 01 de maio de 2016.

CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEPG, p.178, 1999.

CARNELOSSI, P.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; MESQUINI, R.M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 399-406, 2009.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q.; SILVA, R.A. **Manual de doença da soja**. São Paulo: Cheminova Brasil LTDA, p.57, 2010.

CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**. v. 30, n.1, p.1-5, 2008.

CESSNA, S.G. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **Plant Cell**. Rockville, v 12, n [ ], p. 2191 – 2199, nov. 2000.

CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experientiae**, Viçosa, v. 4, n.2, 1964.

CLARKSON, J.P.; STAVELEY, J.; PHELPS, K.; YOUNG, C.S.; WHIPPS, J.M. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 2, p. 213-222, 2003.

COOK, R.J.; BACKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS Press, p.539, 1983.

COSTA, A.R.T.; AMARAL, M.F.Z.J.; MARTINS, P.M.; PAULA, J.A.M.; FIUZA, T.S.; RESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos

fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.2, p. 240- 245, 2011

COSTA, G.R.; COSTA, J.L.S. Efeito dos fungicidas procimidone e benomyl na formação de apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo. In: **21 Congresso Paulista de Fitopatologia**, Botucatu. Resumos...Botucatu: UNESP, p.51, 1998.

CRATO, F.F. do. **Quantificação de escleródios e germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos da cultura da soja tratada química e biologicamente**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia.

COSTA, T.R.; FERNANDES, O.F.L.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA, C.M.A.; LIÃO, L.M.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R.; FERREIRA, H.D.; SALES, B.H.N.; SILVA, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 111-117, 2000.

COSTA, J.F.O.; JUIZ, P.; PEDRO, A.S.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; GIULIETTI, A.M.; FRANÇA, F.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.. **Immunomodulatory Solereder H. systematic anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Claredon Press; 1908.

COSTA, J.L.; RAVA, C.A. Influência da braquiária no manejo de doenças do feijoeiro com origem no solo. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F.; AIDAR, H. **Integração lavoura-pecuária**. EMBARAPA Arroz e Feijão, v.1, p.523-534, 2003.

CUNHA, W.G. **Resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja geneticamente modificadas para expressar o gene da oxalato descarboxilase de *Flammulina velutipes***. 2010. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa, UEPG, p.454, 2010.

DANIELSON, G.A.; NELSON, B.D.; HELMS, T.C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v.88, p.297-300, 2004.

DAVIDSON, A. L.; BLAHUT-BEATTY, L.; ITAYA, A.; ZHANG, Y.; ZHENG, S.; SIMMONDS, D. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection and oxalic acid function in susceptible and resistant soybean. **Plant Pathology**, 2016. DOI: 10.1111/ppa.12514

DE BONA, E.; PINTO, F.G. da. S; FRUET, T.K.; JORGE, T.C.M.; MOURA, A.C.de. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; MAGALHÃES, C.G.; SILVA, C.J; MALTHA, C.R.A.; PINHEIRO, A.L. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. **Molecules**, v.16, p.1181-1191, 2011.

DHINGRA, O.D. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. Viçosa: UFV, p. 11-75, 2005.

DICKMAN, M.B.; MITRA, A. A. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, n. 4, p. 255-263, 1992.

DUTTON, M.V.; EVANS, C.S. Oxalate production by fungi: Its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 9, p. 881-895, 1996.

DONLAPORN, S.; SUNTORNSUK, W. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* Seed Cake. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 319-324, 2010.

ESKER, P.; PELTIER, A.; BRADLEY, C.; CHILVERS, M.; MALVICK, D.; MUELLER, D.; WISE, K. Management of white mold in soybean. **North Central Soybean Research Program**, 2011.

FERRAZ, L.C.L; BERGAMIN, A.; AMORIM, L.; NASSER, L.C.B. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia brasileira**. v. 28, n.1, 2003.

FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. **Doenças da soja no Brasil**. EMBRAPA – CNPSo, Londrina, p. 42, 1979.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, v. 43, p. 337-359, 2005.

GARCIA, R.Á. **Produção de inóculo, efeito de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia.

GARCIA, R.Á.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*= Antifungal activity of vegetable oils and extracts against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, 2012.

GAVASSONI, W.L.; SERRA, A.P.; BACCHI, L.M.; OLIVEIRA, M.; CARVALHO, P.M. Influência de extratos vegetais de plantas cultivadas sobre a germinação carpopêgica de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, suplemento. Ref. 804. **Palestras e resumos do XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Salvador -Bahia. Agosto, 2006.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**. v.119, p.731-737, 2010.

GODOY, G.; STEADMAN, J. R.; DICKMAN, M. B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, n. 3, p. 179-191, 1990.

GOMES, M. de S. **Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus***. 2011. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras.

GONÇALVES, P.R. C. **Reação de progênies de feijão, derivadas de seleção recorrente para mofo branco, ao ácido oxálico**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

GÖRGEN, C.A. **Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* "1306"**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás.

GÖRGEN, C.A.; CIVARDI, E.A.; RAGAGNIN, V.A.; SILVEIRA NETO, A.N.; CARNEIRO, L.C.; LOBO JUNIOR, M. Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.5, n.10, p.1102-1108, 2010.

GOVINDACHARI, T.R.; SURESH, G.; GOPALAKRISNAN, G.; MASLAMANI, S.; BANUMATHI, B. Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. **Fitoterapia**. v. 71, n.3, p.317-320, 2000.

GRAU, D.R. Sclerotinia Stem Rot. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. **Compendium of Soybean Diseases**, APS Press, 3 ed., p 47-48, 1989.

GRAU, C.R. Sclerotinia stem rot of soybean. In: WYLLIE, T.D.; SCOTT, D.H. **Soybean Diseases of the North Central Region**. APS Press, p. 56–66, 1988.

GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; SOUSA, P.E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S.S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agronômica*, v.42, p.464-472, 2011.

GUIMARAES, R.L.; STOTZ, H.U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant physiology**, v. 136, n. 3, p. 3703-3711, 2004.

GUIRALDO, N.; AMBROSANO, E.J.; MENDES, P.C.D.; ROSSI, F.; AVÉRALO, R.A. Medidas de controle de doenças em sistema agroecológicos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 153-156, jan./mar. 2004.

HAREL, A.; GOROVITS, R.; YARDEN, O. Changes in protein kinase an activity accompany sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**. v. 95, n.4, p. 397-404. 2005.

HARIKRISHNAN, R.; DEL RÍO, L.E. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. **Plant Disease**, v.90, p.946-950, 2006.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLE, D.N. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. Wallingford: CAB international, 8. Ed, 1995.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement of shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, n.22, p.273–292. 2005:

HOMECHIN, M. Plantas daninhas hospedeiras de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n 3, p.472, 1982. (Resumo).

HUANG, H. C. Control of *Sclerotinia* wilt of sunflowers by hyperparasites. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.2, n.1, p. 26-32, 1980.

JULIATTI, F.C.; JULIATTI, F.Ca. **Podridão da haste da soja: manejo e uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção**. Uberlândia: Composer, p. 33, 2010.

JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.P.; JULIATTI, F.Ca. **Manejo integrado de doenças na cultura da soja**. Uberlândia, p.32, 2004.

KIM, H.S.; DIERS, B.W. Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Science**, v.40, p. 50-61, 2000.

KIM, T.G.; KNUDSEN, G.R. Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 100-108, 2008.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Agronômica Ceres, 4. Ed, v.2, p.663, 2005.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L.. **Manual de fitopatologia-Princípios e conceitos**. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, c. 34, p. 692-709, 1995.

KLUTHCOUSKI, J. ; AIDAR, H.; STONE, L.F.; COBUCCI, T. **Integração lavoura-pecuária e o manejo de plantas daninhas**. Encarte Técnico Potafós, n. 106, 2004.

KORA, C., MCDONALD, M.R., AND BOLAND, G.J. Sclerotinia rot of carrot: an example of phenological adaptation and bicyclic development of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Diseases**. v. 87: p. 456– 470, 2003.

LEITE, R.M.V.B. de C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Embrapa Soja. Comunicado Técnico**, 2005.

LEITE, R.M.V.B de C.; OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V.; CASTIGLIONI, V. B. R. Incidência de podridão branca causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol semeado após a colheita da safra de verão, no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 2, p. 81–84, 2000.

LOBO JUNIOR, M. **Manejo cultural e aspectos epidemiológicos do mofo branco na cultura da soja**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goiás.

LOPES, L.T.A.; PAULA, J.R de; TRESVENZOL, M.F.; BARA, T.M.F.; STONE, S. de; FERRI, P. H.; FIUZA, T. de S. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limettioides* Tanaka (Rutaceae). **Revista Ciência Farmacológica Básica Aplicada**, v.34, p. 503-511, 2013.

LORENCETTI, G. A. T.; MAZARO, S. M.; POTRICH, M.; LOZANO, E. R.; BARBOSA, L. R.; LUCKMANN, D.; DALLACORT, S.. Alternative Products for *Thaumastocoris peregrinus* Control and Resistance Induction in Plants. **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 4, p. 541-548, 2015.

LUMSDEN, R.D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**. v.69, p. 890-895, 1979.

LUMSDEN, R.D.; DOW, R.L. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. **Phytopathology**, v.63, p. 708–715, 1973.

MAIA, T.F.; DONATO, A. de; FRAGA, M.E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.17, n.1, p.105-116, 2015.

MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v.30, p. 382-387, 2007.

MATOS, F.J.A. **As plantas da farmácia viva**. Fortaleza: Ed. Universidade Federal do Ceará, v.1, p.57, 1997.

MENTEN, J.O.M.; LIMA, L.C.S.F.; FRASE, V.C.; RABALHO, A.A. **Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil**. DFP, cap.12, p. 333-374, 2005.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D. Guerra ao mofo. **Grandes culturas**. Pelotas, v.11, n. 120, p.16-18, 2009.

MILA, A.L.; YANG, X.B. Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotic germination apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.92, p. 78-82, 2008.

MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*, **Brazilian Journal Microbiology**, v. 37, n. 2, p.181-191. 2006.

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 perspectiva**. Jaguariúna, São Paulo: Embrapa Meio Ambiente, v.1, cap.1, p.341, 2009.

MUELLER, D. S.; DORRANCE, A. E.; DERKSEN, R. C.; OZKAN, E.; KURLE, J. E.; GRAU, C. R.; GASKA, J. M.H; ARTMAN, G. L.; BRADLEY, C. A.; PEDERSEN, W. L. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant Disease**, v.86, p.26-31, 2002.

MUELLER, D. S.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant disease**, v. 83, n. 12, p. 1113-1115, 1999.

NASCIMENTO, J.C.; BARBOSA, L.C.A.; PAULA, V.F.; DAVID, J.M.; FONTANA, R.; SILVA, L.A.M.; FRANÇA, R.S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, p.787-799, 2011.

NASSER, L.C.B.; NAPOLEÃO, R.; CARNAVAL, R.A. Mofo branco – cuidado com a semente. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v.1, n.4, p.4, 1999.

NELSON, B. Biology of *Sclerotinia*. In: **Proceedings of the Sclerotinia workshop**. 1998.

OLIVEIRA, C. M. G. Panorama das doenças e pragas em horticultura: doenças causadas por nematoides. **O Biológico**, v. 69, n. 2, p. 85–86, 2007.

PANSERA, M.R.; VICENÇO, C.B.; PRANCUTTI, A.; SARTORI, V.C.; SILVA RIBEIRO, R.T. da. Controle alternativo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary causador da podridão de sclerotinia, com óleos essenciais e extratos vegetais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, n. 3, 2012.

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

PAULA JUNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; LOBO JUNIOR, M.; MORANDI, M.A.B.; CARNEIRO, J.E.S. Mofo branco. In: PRIA, M.D.; SILVA, O.C. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010.

PAULA JUNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; LOBO JÚNIOR, M.; MORANDI, M.A.B.; CARNEIRO, J.E.S.; ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado do mofo branco do feijoeiro**. EPAMIG, Viçosa – MG. p.48, 2006.

PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROZAWA, C. Doenças da alface. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 27-33, 2005.

PELTIER, A.J.; BRADLEY, C.A.; CHILVERS, M.I.; MALVICK, D.K.; MUELLER, D.S.; WISE, K.A.; ESKER, P.D. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of

soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, Annapolis, v. 3, n. 2, p. B1-B7, 2012.

PEREIRA, F.S. de.; BORGES, L.P.; GUIMARÃES, G.R.; SILVA, A. da; GONÇALVES, R.N.; CARVALHO, L.R. de; TEIXEIRA, I.R. Estratégias de controle de mofo branco do feijoeiro. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17, 2013.

PEREIRA, R.B.; PINHEIRO, J.B. **Manejo integrado de doenças em hortaliças em cultivos orgânicos**. Embrapa Hortaliças, 2012. (Circular Técnica 111).

PERINI, V.B. de M.; CASTRO, H.G. de; SANTOS, G.R. dos; AGUIAR, R.W. de S.; LEÃO, E.U.; SEIXAS, P.T.L. Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, p.23-27, 2011.

POMELLA, A.W.V.; RIBEIRO, R.T.S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas—uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 239-244, 2009.

PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**. v. 69, p. 875-880, 1979.

PURKASYASTHA, R.P. Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: DANIEL, M. PURKASYASTHA, R.P. **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. New York: Marcel Dekker, p.1-39, 1995.

RASHID, K.Y.; SWANSON, J. Seed treatment for the control of sclerotinia basal-stalk rot/wilt in sunflower. Ottawa: **Agriculture and Agri-Food Canada**, 1998.

RASOOLI, I.; REZAEI M.B.; ALLAMEH A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. **Food Control**, n.17, p. 359-364, 2006.

REIS, E.M.; BRUSTOLIN, R.; DANELLI, A.D. CASA, R.T. Ciclo do mofo branco. **Revista Plantio**, v. 122, p 28-30, 2011a.

REIS, E.M.; BRUSTOLIN, R.; DANELLI, A.D.; CASA, R.T. Manejo integrado do mofo branco. *Revista Plantio Direto*, v. 122, p. 28-30, 2011b.

REIS, A.; COSTA, H.; LOPES, C. A. **Epidemiologia e manejo do mofo branco em hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças - Comunicado Técnico, n. 45, 5 p. 2007.

RENTSCHLER, L.L.A. **Qualidade fisiológica e uso de extratos e óleos essenciais vegetais no controle de *Alternaria* spp. em sementes de cenoura**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte do Paraná.

RIBEIRO, C.G. **Sensibilidade a fungicidas e caracterização molecular de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2012. Dissertação (Mestrado) – FESURV- Universidade de Rio Verde.

ROCHA, R. **Manejo da podridão de esclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) e míldio (*Bremia lactucae*) na cultura da alface**. 2007. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

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, n. 2, p. 124-128, 2007.

SAHARAN, G.S.; MEHTA, N. *Sclerotinia* diseases of crop plants: Biology, Ecology and Disease Management. São Paulo: **Springer Science**, 2008.

SAINDON, G.; HUANG, H.C.; KOZUB, G.C.; MÜNDEL, H.H.; KEMP, G.A. Incidence of white mold and yield of upright bean grown in different planting patterns. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.137, n.2, p.118-124, 1993.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, v. 1, p. 125-138, 2005.

SCHWARTZ, H. F.; HARVESON, R. M.; STEADMAN, J. R. White mold of dry beans. Published by University of Nebraska-Lincoln Extension, **Institute of Agriculture and Natural Resources**, 2012.

SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R.; COYNE, D.P. Influence of *Phaseolus vulgaris* blossoming characteristics and canopy structure upon reaction to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, St Paul, v.68, n.3, p.465-470, 1978.

SILVA, G.B.P da. Utilização de *Trichoderma* spp. No controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e no crescimento de alface. 2013. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria.

SILVA, L.J.; SILVA, M.S.; SILVA, L.N.; RABELLO, A.R.; ALVES, R.S.; ESPÍNDOLA, L.S.; PAULA, J.E.; VIEIRA, E.A.; LIMA, T.R.; ANJOS, J.R.N. Fungos fitopatogênicos de soja são sensíveis a extratos orgânicos de planta “fruta-do-conde”, nativa do cerrado do gênero *Annona* sp. (Família Annonaceae). In: **SIMPOSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2.**, 2008, Brasília. Anais... Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

SHARMA. B.K.; BASANDRAI, A.K. Effect of biocontrol agents, fungicides and plant extracts on sclerotial viability of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Indian Journal of Agricultural Sciences**. v.67, p.132-133, 1997.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163, p. 337-344, 2008.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.11, 1994.

SILVA, F.P.M. da. **Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas**. 2007. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal da Grande Dourados.

SILVA, C.J.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; PINHEIRO, A.L.; DIAS, I.; ANDRADE, N.J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v.33, p.104-108, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 5.ed. ,cap. 18, p. 475, 2004.

SOUZA, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA JUNIOR, J.G.; MIRANDA, A.T.B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M.R.R. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO. v. 33, p. 247-249, 2002.

SOYLU, S.; YIGITBAS, H.; SOYLU, E.M.; KURT, Ş. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 4, p. 1021-1030, 2007.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.2, n.11, p.16-21, 1999.

STEADMAN, J.R. White mold - a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**. v. 67, p. 346-350, 1983.

STEADMAN, J.R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**. St Paul, v.9, n.8, p. 904 – 907, 1979.

STEFANELLO, J.; SCHWINGEL, M. E.; GARCEZ, F.; GARCEZ, W.; GAVASSONI, W.L. Sobrevivência e potencial de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* influenciados por extratos vegetais de plantas do cerrado. **Anais do EIC VII Encontro de iniciação científica da UFMS**. Campo Grande, MS. Outubro, 2006.

SUTTON, D.C; DEVENRALL, B.J. Studies on infection of beans (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, Madison, v.32, n.2, p. 251-261, 1983.

TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HUANG, B.; HE, J.; WANG, Y. In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. **Food Control**, v. 22, p. 1992-1999, 2011.

TOWNSEND, B.B.; WILLETTS, H.J. The development of sclerotia in certain fungi. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 37, p. 213–221, 1954.

TWENGSTRÖM, E.; KOPMANS, E.; SIGVALD, R.; SVENSSON, C. Influence of different irrigation regim on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal Phytopathology**, v.146, p. 487-493, 1998.

VAN DER PLANK, J.E. **Plant disease: epidemic and control**. New York: Academic, p. 349, 1963.

VENETTE, J. Sclerotinia spore formation, transport and infection. In: **Proceedings of the Sclerotina Workshop**. 21 January 1998. Fargo, North Dakota, USA, 1998.

VIEIRA, R. **O mofo branco do feijoeiro - Feijão no inverno**, Informe Agropecuário, Belo Horizonte (EPAMIG), v. 17, n. 178, p. 54-63, 1994.

VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. In: VIEIRA, R.F. (ed). **Mofo branco no feijoeiro**. Belo Horizonte: Informe Agropecuário, v.17, p. 54-63, 1994.

WHETZEL, H.H. Synopsis of the genera and species of the Sclerotiniaceae, a family of stromatic inoperculate discomycetes. **Mycologia**, v.37,p. 648–714, 1945.

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.;TAN, Y.; PLOPER, L. D.; PORTA-PUGLIA, A.; YORINORI, J. T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, p.115–121, 2001.

ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; SOUSA, B.F.M.; MATOS, S.F.M. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, v. 28, p.782-789, 2012.

## **CAPÍTULO 1 - ATIVIDADE DO PRODUTO COMERCIAL A BASE DE ÓLEO DA CASCA DE LARANJA (*Citrus sinensis*) SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO CARPOGÊNICA DE *Sclerotinia sclerotiorum*.**

### **RESUMO**

O crescimento micelial e a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* foram avaliados sob diferentes concentrações do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja (Orobor N1). Foram utilizadas as concentrações 0, 50, 100, 150, 200 e 250 mL.100 L<sup>-1</sup> de água, do produto comercial, incorporadas ao meio de cultura BDA e vertido em placas de Petri, onde depositou-se um disco de 6 mm de BDA de micélio de cada isolado e foram incubadas a 22 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi conduzido em DIC em esquema fatorial, com 5 isolados x 6 concentrações, com quatro repetições. Foram feitas medições diárias do diâmetro da colônia, até que o fungo colonizasse todo o meio de cultura. Para a germinação carpogênica, depositou-se 200g de solo/caixa tipo gerbox, foi adicionado água destilada e esterilizada até que atingisse 62% da C.C. do solo. Foram depositados 16 escleródios/gerbox e, em seguida foram aplicadas as mesmas concentrações do produto, atingindo 100% da C.C.. Foram incubados a 19±2 °C e fotoperíodo de 12 h. O experimento foi conduzido em DIC em esquema fatorial, com 5 isolados x 6 concentrações, com três repetições. As avaliações foram efetuadas contando-se o número de escleródios germinados, estipes e apotécios formados por caixa, aos 30, 45, 60 e 75 após a implantação do experimento. Detectou-se que nas maiores concentrações resultaram em maiores porcentagens de inibição e, a partir da concentração de 100 mL.100 L<sup>-1</sup>, também foi observada a redução da produção de escleródios. Verificou-se que o produto não inibiu a germinação carpogênica.

**PALAVRAS-CHAVE:** mofo branco, fitoterapia, escleródios.

**CHAPTER 1 - ACTIVITY OF COMMERCIAL PRODUCT ORANGE PEEL OIL BASED (*Citrus sinensis*) MYCELIAL ON GROWTH AND GERMINATION carpogenic OF *Sclerotinia sclerotiorum*.**

**ABSTRACT**

The mycelial growth and germination carpogenic of *Sclerotinia sclerotiorum* were evaluated under different concentrations of the commercial product the basis of essential oil of orange peel (Orobor N1). The concentrations used were 0, 50, 100, 150, 200 and 250 mL.100 L<sup>-1</sup> of water, of the commercial product, incorporated into the PDA culture medium and poured in Petri plates, deposited a disk of 6 mm of the BDA mycelium of each isolate and were incubated at 22 ± 2 °C and photoperiod of 12 hours. The experiment was conducted in DIC in factorial scheme, with 5 isolates x 6 concentrations, with four repetitions. Were made daily measurements of the diameter of the colony, until the fungus colonized throughout the culture medium. For germination carpogênica, he was the 200g soil/washed, type box was added sterile distilled water until reaching 62% of the C.C. soil. Were deposited 16 sclerotic/washed and then were applied the same concentrations of product, reaching 100% of C.C.. Were incubated at 19±2 °C and photoperiod of 12 h. The experiment was conducted in DIC in factorial scheme, with 5 isolates x 6 concentrations, with three repetitions. Assessments were performed by counting the number of germinated sclerotic, stems and apothecia formed per box, at 30, 45, 60 and 75 after the implantation of the experiment. It was detected that in the higher concentration resulted in higher percentages of inhibition and, from the concentration of 100 mL.100 L<sup>-1</sup>, was also observed a reduction in the production of sclerotic. It was found that the product does not inhibited the germination carpogênica

**KEY WORDS:** white mold, herbal medicine, sclerotia.

## 1 INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* foi descrito por Antony De Bary em 1884 como o agente etiológico do mofo branco. É um fungo cosmopolita e de hábito necrotrófico, que sobrevive no solo por meio de estruturas de resistência conhecidas como escleródios, as quais dificultam o seu controle. É dependente de condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da doença como temperaturas variando entre 15 a 21 °C, alta umidade do solo e ar (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

Segundo Boland e Hall (1994), o fungo é patogênico a 78 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas, infectando espécies economicamente importantes como soja, feijão, algodão, tomate, ervilha, ervilhaca, alface, chicória, repolho, couve-flor, cenoura e entre outras (PAVAN et al., 2005; REIS et al., 2011). Também há relatos de plantas daninhas hospedeiras.

Na busca por uma agricultura mais sustentável, juntamente com a crescente demanda por produtos saudáveis, os sistemas de produção orgânica vêm ganhando destaque no mercado nacional. O principal foco deste tipo de sistema produtivo é a sustentabilidade econômica e ecológica do ecossistema, onde é priorizado a utilização de métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contrapartida à utilização de materiais com origem sintética, organismos geneticamente modificados (BRASIL, 2007). Com isso, é crescente a busca por métodos de controle tanto de pragas quanto de doenças alternativos a utilização de agroquímicos.

Pesquisas vêm mostrando a eficiência na utilização de produtos naturais, entre os quais extratos e óleos essenciais de plantas no controle de microrganismos, por meio da exploração da atividade biológica de compostos secundários das plantas como alcaloides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides, compostos presentes nos extratos e óleos essenciais de plantas (SILVA et al., 2005).

De acordo com Bakkali et al. (2008) os óleos essenciais são compostos complexos, naturais, voláteis e caracterizados por forte odor. Podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, esses desempenham papel de proteção das plantas como agentes antimicrobianos, além de alguns atuarem como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica (STANGARLIN et al., 1999; SANTOS, 2010).

A ação antimicrobiana dos óleos e extratos está ligada diretamente a sua característica lipofílica, que permite a interação destes com a membrana celular, tornando-a permeável e

causando modificações estruturais (BAKKALI et al., 2008). Rasooli et al. (2006) verificaram que o fungo *Aspergillus niger* apresentou alterações morfológicas nas hifas, interrupção e destruição das membranas plasmáticas e mitocondriais com a ação dos óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock*.

Garcia et al. (2012a) verificaram que a associação entre o óleo de Karanja e o nim indiano proporcionaram melhor efeito inibitório do crescimento micelial do patógeno *S. sclerotiorum*, demonstrando assim efeito sinérgico. Até o momento, não existem relatos da utilização do emprego de produtos comerciais à base de óleos essenciais sobre o patógeno causador do mofo branco. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial e a germinação carpogênica de escleródios de diferentes isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*, sob diferentes concentrações do produto comercial a base do óleo essencial da casca de laranja.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os isolados utilizados na condução deste experimento (Tabela 1) foram obtidos na forma de escleródios junto a instituições de pesquisa e em lavouras comerciais localizadas no município de Chapadão do Sul – MS. Os escleródios foram desinfestados superficialmente pela imersão em álcool (70%) por 30 segundos e hipoclorito de sódios (0,5%) por 60 segundos, e imediatamente lavados em água destilada esterilizada, e plaqueados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubados em BOD a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. Após germinar miceliogênica, discos de micélio foram transferidos para frascos tipo “ependorfs”, que foram lacrados e armazenados em refrigerador a  $5^\circ\text{C}$ , para a manutenção dos isolados.

Tabela 1. Origem dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizados no experimento, Chapadão do Sul –MS, 2015.

Isolado	Local de origem	Cultura
S1	Chapadão do Sul - Coleção UFMS	Soja
S2	Dourados - Coleção UFGD	Soja
S3	Chapadão do Sul - Coleção UFMS	Girassol
S4	Chapadão do Sul - Coleta	Soja
S5	Minas Gerais - Coleta	Soja

## 2.2 Produção dos escleródios

A partir dos isolados recuperados, foram produzidos os escleródios, em condições laboratoriais, necessários para a condução deste experimento.

Para a produção dos novos escleródios, foi utilizado o substrato de feijão (100 g de grãos de feijão + 10 mL de água), que foi adicionado em frascos erlenmeyer de 500 mL. Este substrato foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C e, após o resfriamento, foram adicionados cinco discos de micélio do fungo, com sete dias de idade, retirados da região de ativo crescimento das colônias fungicas. Posteriormente, os frascos foram incubados em B.O.D. a 25±2 °C, na ausência de luz, por 30 dias consecutivos, conforme metodologia modificada de Garcia et al. (2012b).

Decorrido este período, os escleródios foram separados através de lavagem em água corrente com o auxílio de peneiras, e em seguida foram desinfestados com álcool (70%) por 30 segundos e hipoclorito de sódio (0,5%) por 60 segundos, enxaguados em água destilada e esterilizada, levados para secar dentro de câmara de fluxo sobre papel filtro, logo depois foram identificados e acondicionados em sacos de papel “kraft”.

## 2.3 Delineamento experimental e análise de dados

Nos experimentos, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial com seis concentrações do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja e cinco isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*. Na avaliação do crescimento micelial foram utilizados quatro repetições, onde cada placa de Petri correspondeu a uma repetição. Para a avaliação da germinação carpogênica, foram utilizados três repetições, onde cada parcela experimental foi constituída de uma caixa tipo gerbox, os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$ . Foi realizada a análise de variância com o auxílio do programa Sisvar (FEREIRA, 2014), e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, e os dados quantitativos foram submetidos à análise de regressão.

## 2.4 Avaliação *in vitro* da atividade biológica do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*

Para avaliar o efeito do produto comercial Orobor®, composto por óleo essencial da casca de laranja (*Citrus sinensis*), foram utilizadas as seguintes concentrações do produto 50, 100, 150, 200 e 250 mL.100 L<sup>-1</sup> de água, além de um tratamento testemunha, sem a adição

óleo de laranja. Houve a mistura do óleo, nas diferentes concentrações avaliadas, ao meio de cultura BDA fundente (50 °C), sendo depositados 20 mL por placa de Petri.

Após a solidificação discos de 6 mm de diâmetro, contendo micélio do fungo com sete dias de idade, foram colocados sobre o meio de cultura, no centro da placa de Petri. Posteriormente, as placas foram incubadas em BOD a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro, de acordo com a metodologia de Garcia et al. (2012a).

As avaliações, realizadas diariamente, iniciaram-se 24 horas após a incubação e foram encerradas 96 horas após, quando todas as testemunhas dos isolados utilizados atingiram toda a superfície do meio, mensurou-se o diâmetro médio das colônias, ou seja, a média do crescimento dois eixos ortogonais. E após 14 dias da implantação do experimento, foram contados os escleródios produzidos em cada placa/tratamento.

O índice de velocidade de crescimento foi obtido pelo somatório da diferença entre o diâmetro médio atual da colônia, em cm, pelo diâmetro médio da colônia do dia anterior, pelo produto do número de dias após a incubação, por meio da fórmula, descrita por Oliveira (1991):  $[\sum ((\text{diâmetro médio atual da colônia} - \text{diâmetro médio da colônia do dia anterior}) / \text{número de dias após a incubação})]$ .

A inibição do crescimento do patógeno (%) foi obtida comparando-se o diâmetro médio, em cm, entre as colônias sob tratamentos e a testemunha, após quatro dias de incubação, por meio da fórmula, descrita por Abbott (1925):  $[\text{PICM} = (\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) / \text{diâmetro da testemunha}] \times 100]$ .

## **2.5 Avaliação do efeito do produto comercial à base de óleo essencial da casca de laranja sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum***

O experimento foi conduzido empregando-se solo esterilizado em autoclave duas vezes por 1 hora a  $120^\circ\text{C}/1 \text{ atm}$ , com um intervalo de 24 horas.

Os escleródios produzidos foram desinfestados de acordo com a metodologia descrita por Delgado et al. (2007), havendo a imersão dos mesmos, por 30 segundos, em solução de hipoclorito de sódio a 2%, seguida de imersão, pelo mesmo tempo, em água destilada esterilizada. Este procedimento foi repetido três vezes e, posteriormente, foram mantidos em câmara de fluxo de ar sobre papel filtro até secarem.

Para garantir ambiente adequado para produção de estipes e apotécios, sem interferência do excesso de umidade, foi utilizada a capacidade de campo (C.C.) para umedecer o solo, conforme metodologia de Crato (2013), no entanto, foi necessária adaptação da mesma para inclusão do óleo. Portanto, após distribuição de 200g de solo seco por caixa

tipo gerbox (11 cm x 11 cm x 3,5 cm), foram adicionados 20 g de água destilada esterilizada por parcela para elevar o solo inicialmente seco até a condição de 62% da C.C., reservando o restante (38%) para inclusão do produto. O produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja (Orobor N1), foi aplicado em 12,10 g de água as concentrações de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 mL.100L-1 de água, atingindo assim 100% da C.C.. A incubação foi realizada em B.O.D., a  $19\pm 2$  °C e fotoperíodo 12 horas luz e 12 horas escuro.

O solo durante todo o experimento foi mantido a 100% da C.C. Quando a umidade do solo abaixava, era adicionada, com um minipressurizador manual, quantidade de água destilada de modo a manter a umidade de incubação constante.

As avaliações foram efetuadas contando-se o número de estipes e apotécios formados por caixa. A primeira avaliação foi feita aos 30 dias após a implantação do experimento e as restantes, distanciadas em 15 dias, ate completar 75 dias de incubação.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliações *in vitro* da atividade biológica do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja (*Citrus sinensis*) sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*

Detectou-se interação significativa ( $p\leq 0,05$ ) das concentrações do produto comercial a base de óleo essencial da casca da laranja sobre o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) dos cinco isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Tabela 2). Tanto o IVCM quanto o PICM e o número de escleródios formados, se ajustaram ao modelo quadrático (Figuras 1, 2 e 3).

Tabela 2. Resumo da análise de variância do índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM), em função das concentrações do produto comercial (Orobor N1).

FV	G.L. <sup>1</sup>	IVCM	PICM	Nº Escleródios
Isolado (I)	4	1,23*	242,48*	46,82*
Concentração do Produto (C)	5	44,08*	26584,59*	1266,45*
I x C	20	0,37*	114,99*	32,09*
CV (%)		25,09	5,68	33,22
Nº Observações		120	120	120

\* Significativo a 5% de probabilidade; <sup>1</sup> G.L.: Grau de Liberdade

Para o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) observou-se que a testemunha após 96 horas, colonizou toda a placa, cujos IVCM variaram de 4,19 (S1), 4,67 (S2), 3,16 (S3), 4,43 (S4) e 3,24 (S5), enquanto para a concentração de 50 mL.100 L<sup>-1</sup> o IVCM foi de 0,89 (S1), 1,16 (S2), 0,62 (S3), 1,46 (S4) e de 0,31 (S5), ou seja, houve redução de entorno de 70% na velocidade de crescimento, para todos os isolados testados (Figura 1). Entretanto essa diminuição tendeu a zero à medida que as concentrações se aproximaram de 200 mL.100 L<sup>-1</sup>, para os isolados 1, 2, 3 e 4.

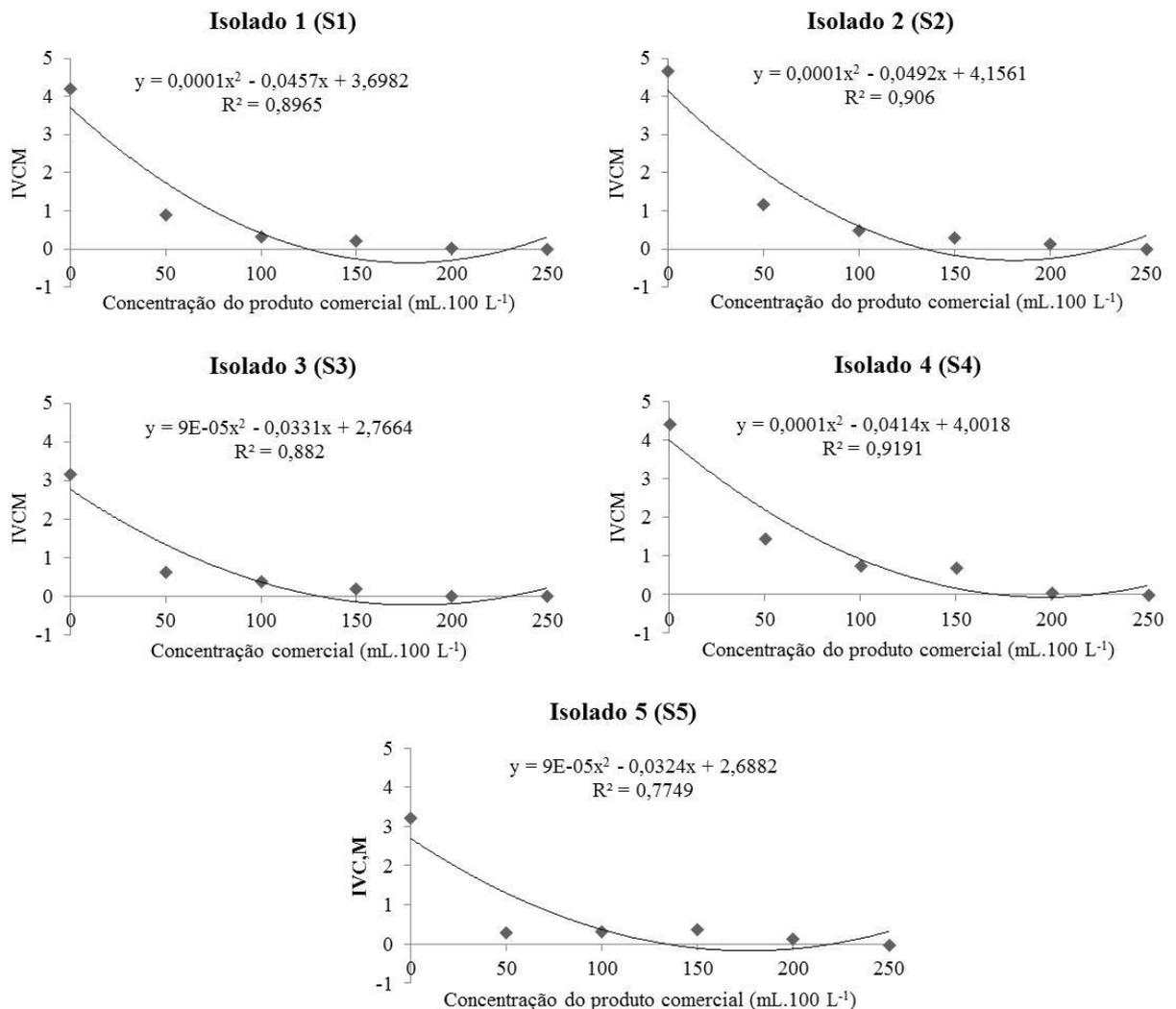


Figura 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), média de quatro repetições, dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* em relação às concentrações do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja (Orobor N1).

Portanto as concentrações testadas reduziram a índice de crescimento do patógeno sobre o meio de cultura BDA, inibição total do crescimento micelial nas concentrações de 200

mL.100 L<sup>-1</sup> para os isolados 1 e 3, e na concentração de 250 mL.100 L<sup>-1</sup> para o isolado 2. Estes resultados discordam aos obtidos por Lorenzetti et al. (2011), onde os óleos essenciais de laranja (*Citrus sinensis* var. *dulcis*), e de tangerina (*Citrus nobilis* var. *tangerinae*) não demonstraram controle para os patógenos *Botrytis cinérea*, os quais citam que o limoneno não apresenta boa atividade fungicida ou fungistática em alguns patossistemas. No entanto, segundo Al-Reza et al. (2010) afirmam que muitas vezes é difícil comparar resultados obtidos em diferentes estudos, pois a composição e a quantidade dos óleos podem variar dependendo da região geográfica, variedade, idade da planta, método de secagem e extração do óleo.

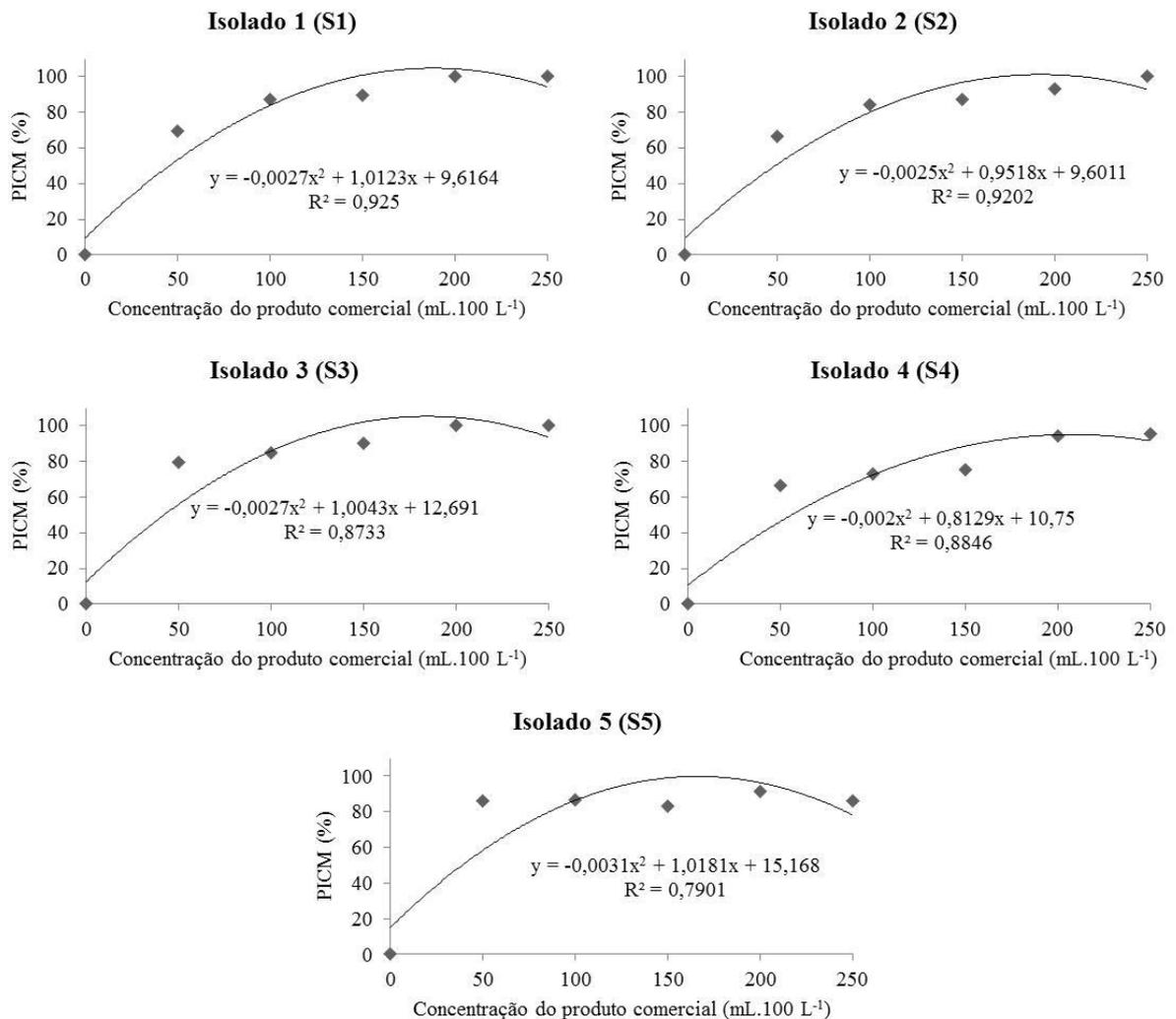


Figura 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM), média de quatro repetições, dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, em relação às concentrações do produto comercial base de óleo essencial da casca de laranja (Orobor N1).

À medida que o IVCM reduziu, houve aumento do PICM para todas as concentrações avaliadas (Figuras 1 e 2). Sendo que na maior concentração de 250 mL.100 L<sup>-1</sup> proporcionou 100% de inibição do crescimento micelial (PICM) para os isolados S1, S2 e S3. No entanto, para S4 e S5, a inibição do crescimento foi de 95,79% e 85,79% (Figuras 2). O mesmo foi verificado por Teixeira et al. (2012), onde os óleos essenciais das cascas frescas e secas de citrumelo Swingle proporcionaram porcentagem de inibição micelial do fungo *S. sclerotiorum* dependente das concentrações testadas, verificando assim o efeito-dose dependente e evidencia assim seu efeito antimicrobiano.

Quanto á variável de IVCM, os valores corroboram com a variável de PICM, evidenciando assim que o produto comercial apresenta fungitoxicidade nas diferentes concentrações testadas, fato que inibe o pleno desenvolvimento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, interferindo diretamente na velocidade de colonização do meio.

Os resultados apresentados nas Figuras 1 e 2 corroboram com os obtidos por Gomes et al. (2011), que relataram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies de *Citrus* sobre o crescimento e/ou inibição micelial sobre os patógenos *Fusarium oxysporum* e *Alternaria alternata*. Estes autores observaram que a inibição do crescimento aumentou proporcionalmente com o aumento das concentrações dos óleos essenciais.

Há um consenso de que a grande maioria dos compostos atua diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações estruturais e funcionais (BURT, 2004). A qual a característica de lipofilicidade permite que estes atravessem a membrana, rompendo a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, alterando a permeabilidade das organelas (BAKKALI et al., 2008). Sendo assim, o efeito da perturbação da membrana citoplasmática, há a ruptura do fluxo elétrons, a alteração no transporte de moléculas através da atividade de certas enzimas e a coagulação do conteúdo citoplasmático (BURT, 2004).

Estudos realizados por Sharma e Tripathi (2006), avaliando-se a atividade fungicida do óleo da casca de *Citrus sinensis* sobre 10 patógenos de pós-colheita, esta atribuída ao limoneno (molécula pertencente à família dos terpenos) e o sinergismo dos diferentes compostos presentes no óleo essencial. Também foi verificado por Teixeira et al. (2012), a ação antimicrobiana dos monoterpenos, limoneno, sequiterpeno cíclico e transcariofileno, que são componentes do óleo essencial da casca de Citrumelo Swingle, sobre os patógenos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum musae*.

O limoneno é o constituinte majoritário do óleo essencial da casca de laranja, o qual possui atividade antimicrobiana sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Alternaria alternata*

(GUIMARÃES et al., 2011). Segundo Maróstica Júnior e Pastore (2007) afirmam que o feito inibidor do limoneno em microrganismos, é creditado a diminuição da velocidade do processo fosforilação oxidativa, aumentando a flacidez das membranas dos fungos filamentosos, o que leva a permeabilidade inespecífica, perda da integridade celular, decréscimo da matéria seca e inativação da energia metabólica.

Foi avaliada também a produção de estruturas de resistência, após 14 dias de incubação. Onde os isolados S1, S2, S3 e S4 tiveram uma redução significativa da produção de escleródios, sendo que a partir da concentração de 100 mL.100L<sup>-1</sup> não houve a formação dessas estruturas (Figura 3). Para o S5 a partir da concentração de 200 mL.100 L<sup>-1</sup>, houve a produção de uma única estrutura. Rodrigues et al. (2007), estudaram o efeito do extrato bruto aquoso (EBA) de gengibre sobre o crescimento micelial de e a produção de escleródios de *S. sclerotiorum in vitro*, observaram que o EBA na concentração maior o crescimento micelial foi inibido em 92,5% e a produção de escleródios a inibição não alcançou o valor de 30%.

De acordo com Townsend e Willetts (1954), a formação dos escleródios se da em três fases distintas: a agregação de hifas, desenvolvimento no tamanho e a maturação juntamente com a deposição de melanina. Podendo assim concluir que devido à redução do crescimento micelial, há diretamente uma diminuição na formação de escleródios, corroborando com os dados obtidos nas Figuras 1 e 2.

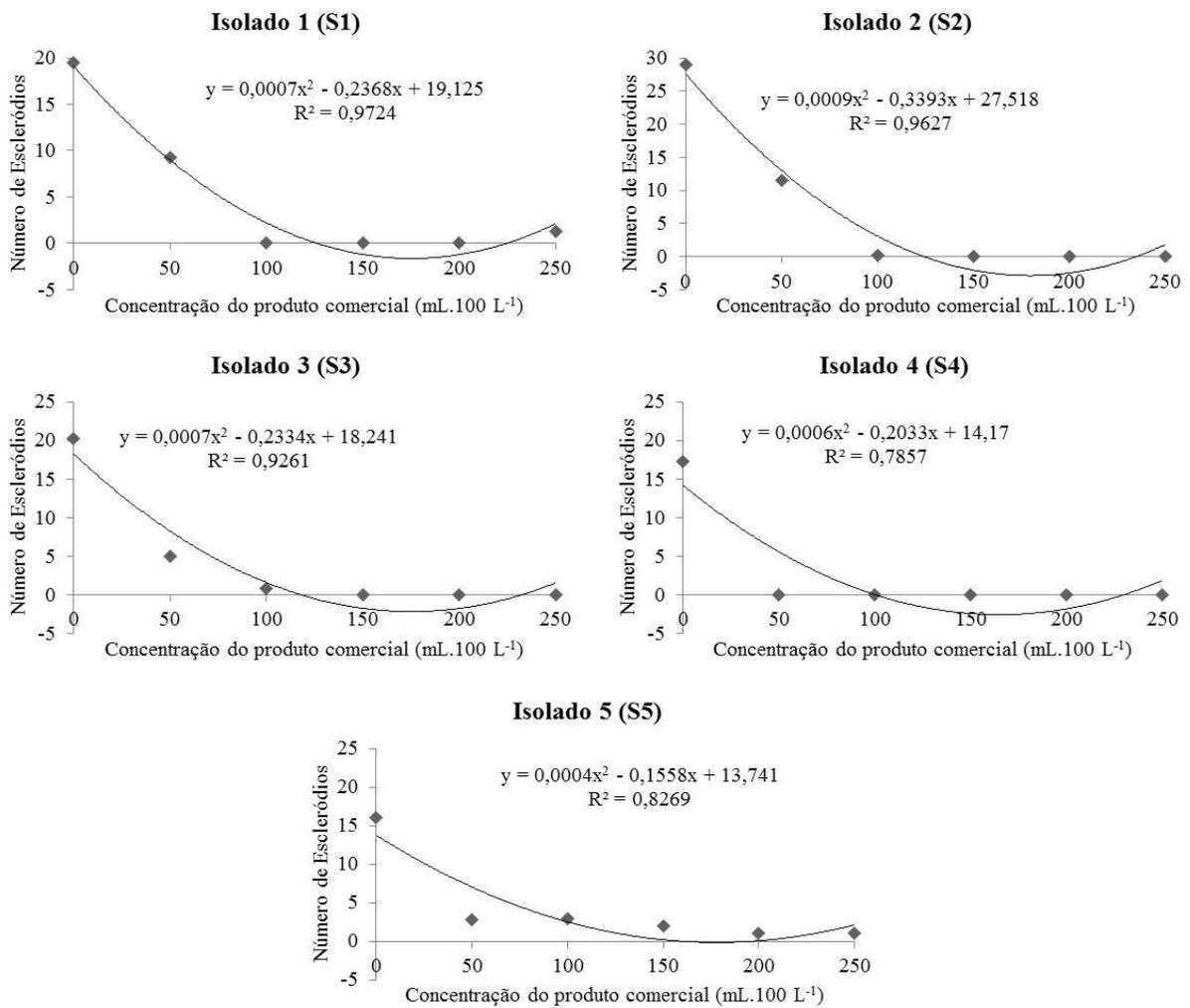


Figura 3. Produção de escleródios, média de quatro repetições, aos 14 dias após a implantação do experimento, dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, em relação às concentrações do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja (Orobor N1).

### 3.2 Avaliação do efeito do produto comercial a base de óleo essencial da casca de laranja sobre a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*

Detectou-se interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) das concentrações do produto comercial, composto por óleo essencial da casca da laranja sobre a formação carpogênica dos escleródios no solo (Tabela 3). Tanto os dados de porcentagem de germinação carpogênica quanto os dados de número de estipes formados e número de apotécios formados se ajustaram ao modelo linear (Figuras 4 e 5).

Tabela 3. Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação carpogênica, número de estipes formados (NEF) e número de apotécios formados (NAF), em função das concentrações do produto comercial (Orobor N1).

FV	G.L. <sup>1</sup>	Germinação (%)	NEF	NAF
Isolado (I)	4	49,11*	18,81*	21,19*
Concentração do Produto (C)	5	11,15*	18,81*	3,75*
Tempo (T)	3	699,36*	380,59*	368,49*
I x C	20	13,58*	9,58*	7,05*
I x D x T	60	1,79 <sup>ns</sup>	1,17 <sup>ns</sup>	1,67 <sup>ns</sup>
CV (%)	-	22,01	24,59	28,30
Nº Observações	-	360,00	360,00	360,00

\* Significativo a 5% de probabilidade; 1 G.L.: Grau de Liberdade

O óleo essencial da casca da laranja não proporcionou efeito inibitório da germinação carpogênica dos cinco isolados utilizados de *S. sclerotiorum*. As concentrações do produto empregado sobre os escleródios apresentaram efeitos distintos na porcentagem da germinação carpogênica. Nos isolados 1, 2, 3 e 5 o produto a base de óleo de laranja estimulou a germinação carpogênica dos mesmos (Figura 4), na qual a testemunha apresentou menor porcentagem de germinação carpogênica em relação às concentrações utilizadas, verifica-se que para a 250 mL.100 L<sup>-1</sup> foram de 73,96%, 76,04%, 46,35% e 45,43%, respectivamente. O mesmo foi observado por Zanella e colaboradores (2015), ao avaliarem o efeito de extratos metanólicos de *Annona cacans*, *Annona coriácea* e *Annona dioica* sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*, a testemunha apresentou menor germinação em relação aos demais tratamentos.

Segundo Zanella et al. (2015) afirmam que o efeito estimulante da germinação carpogênica sob alguns extratos pode ser positivo no manejo do mofo branco, por estimular a germinação dos escleródios em culturas não hospedeiras, acarretando diminuição do inóculo na área, além de evitar a fase mais suscetível da cultura, época de florescimento, à infecção pelo patógeno.

Dentre os isolados utilizados, apenas o S4 apresentou sensibilidade às concentrações utilizadas, reduzindo a germinação dos escleródios, nas maiores concentrações 150, 200 e 250 mL.100 L<sup>-1</sup> do produto, houve as maiores reduções dos valores de germinação carpogênica de 52,08%, 38,69% e 32,24%, respectivamente (Figura 4).

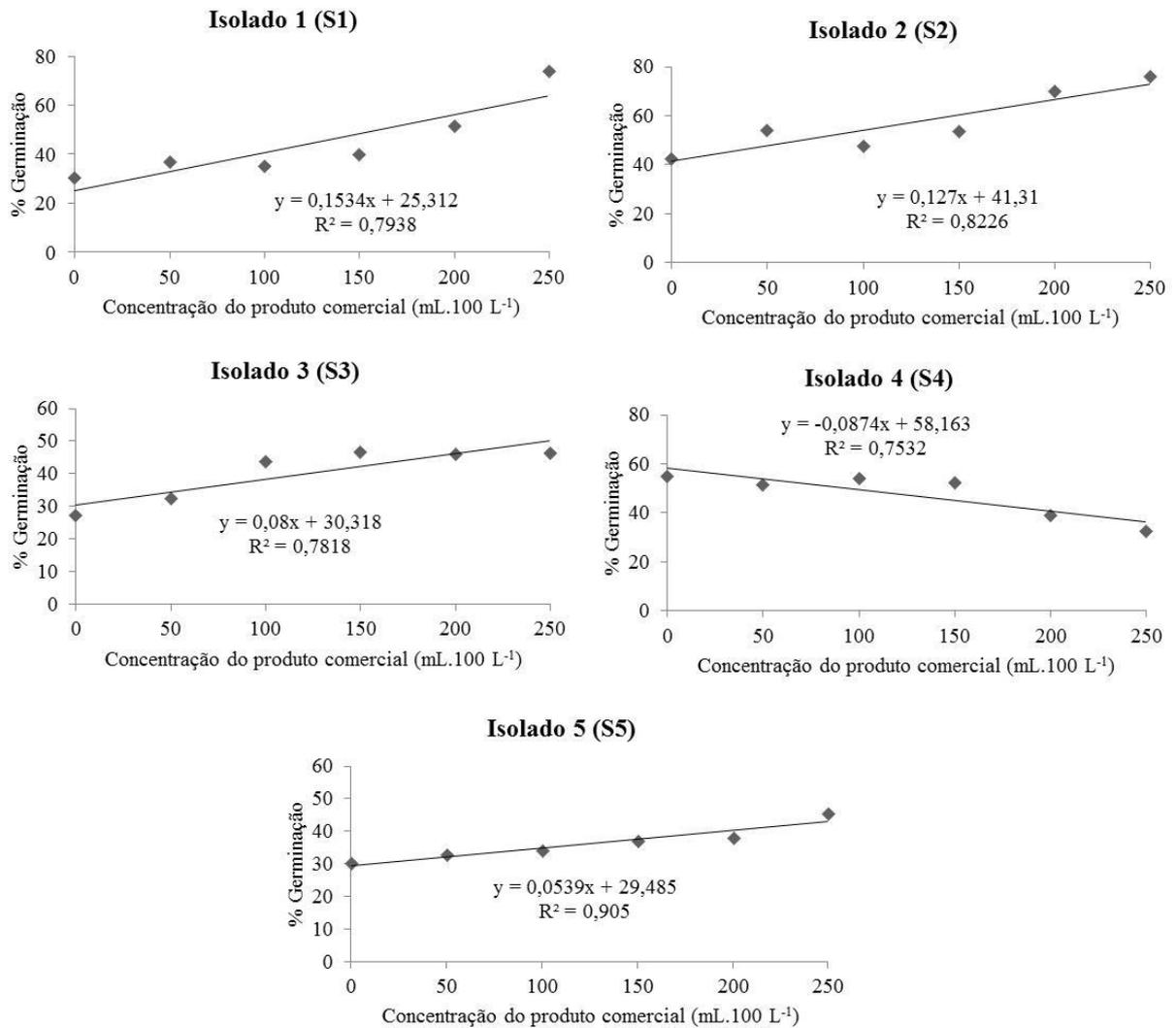


Figura 4. Germinação carpogênica (%) total dos isolados de *S. sclerotiorum* em função das concentrações do produto comercial a base de óleo essencial de casca de laranja.

Os diferentes comportamentos dos isolados utilizados frente à aplicação do produto comercial podem estar relacionados à grande variabilidade genética encontrada nos isolados de *S. sclerotiorum*, mesmo em uma pequena área geográfica, que sugere que há a possibilidade de adaptação do patógeno as mudanças ambientais, através de genes de resistência presentes uma determinada população do patógeno (RIBEIRO, 2012). Onde mesmo pode ocorrer em escleródios, produzidos por um único isolado pode apresentar variabilidade genética, podendo responder diferentemente ao tratamento recebido (SILVA, 2007).

Os resultados obtidos nas avaliações do número de estipes e apotécios formados (Figura 5) corroboram com os apresentados na figura 1, onde apenas o isolado 4 foi inibido pelo produto a base de óleo essencial da casca de laranja através da redução da formação de

estruturas de resistência, na medida em se aumentaram as concentrações. A produção de estipes, foi de 27,17 estruturas na concentração de 0 mL.100 L<sup>-1</sup>, enquanto na de 250 mL.100 L<sup>-1</sup> foi de 17,67 estruturas formadas. A formação de apotécios, nas concentrações de 0 mL.100 L<sup>-1</sup>, foi de 20,92 e, na de 250 mL.100 L<sup>-1</sup> de 13,33 estruturas formadas. Segundo Görgen (2009) e Crato (2013) a formação das estruturas se dá através do crescimento das células fúngicas, que inicialmente rompe a casca do escleródio e continua crescendo como ramificações em forma de tubo, os estipes, que quando são expostos à luz ultravioleta se diferenciam em apotécios, corpos de frutificação com formato de taça (CRATO, 2013).

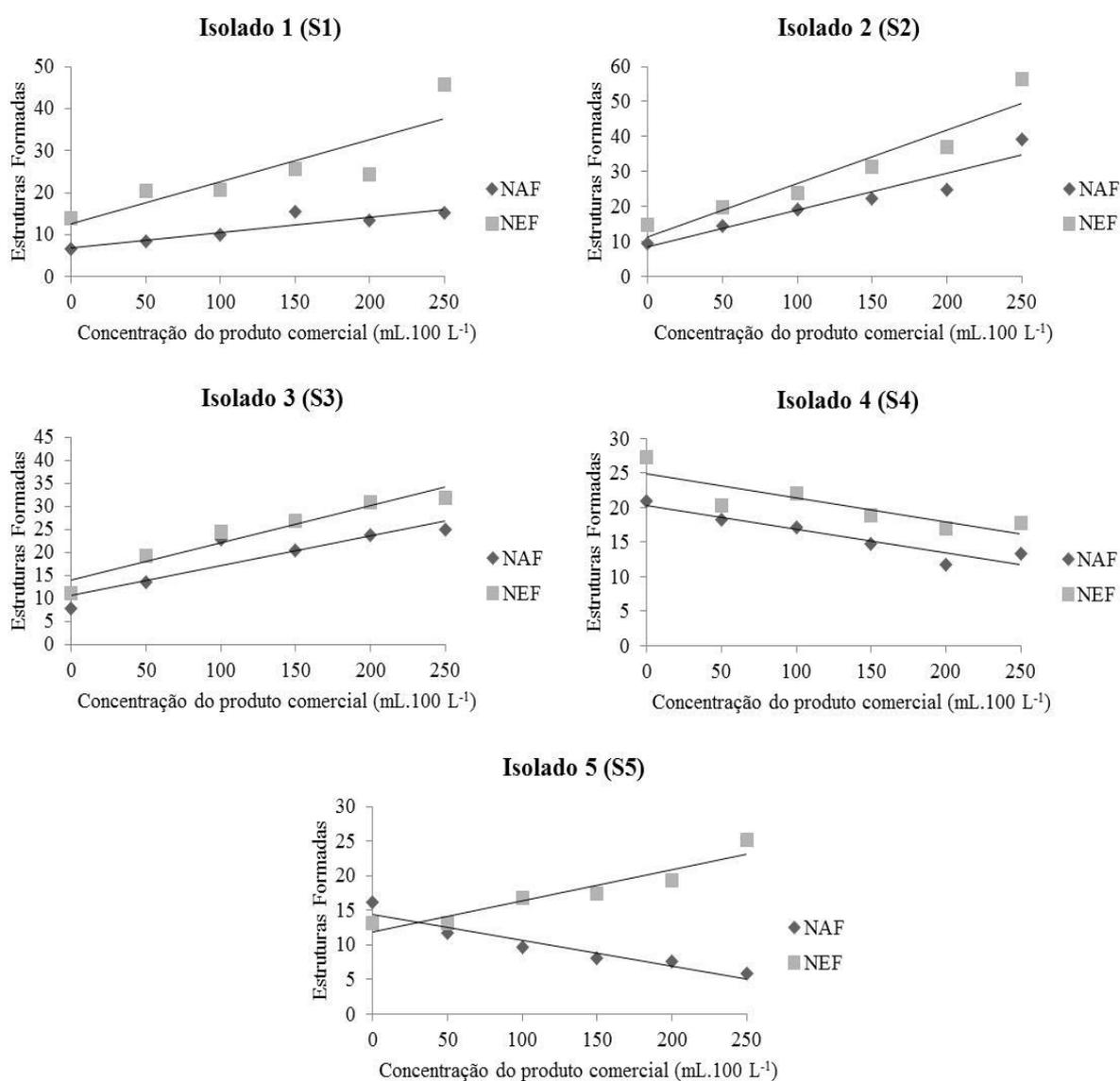


Figura 5. Número de estipes formados (NEF) total e número de apotécios formados (NAF) total dos isolados de *S. sclerotiorum*, em função das concentrações do produto comercial a base de óleo essencial de casca de laranja.

Tabela 4. Equações e coeficiente de determinação, dos gráficos representados na Figura 5.

Isolado		Equação	R <sup>2</sup> *
S1	NEF <sup>1</sup>	$y = 0,0998x + 12,655$	0,7451
	NAF <sup>2</sup>	$y = 0,0361x + 6,9114$	0,8215
S2	NEF	$y = 0,1527x + 11,422$	0,9123
	NAF	$y = 0,1049x + 8,4781$	0,9123
S3	NEF	$y = 0,0809x + 13,917$	0,9299
	NAF	$y = 0,0648x + 10,718$	0,8099
S4	NEF	$y = -0,0348x + 24,809$	0,7463
	NAF	$y = -0,0341x + 20,254$	0,8897
S5	NEF	$y = 0,0452x + 11,832$	0,8884
	NAF	$y = -0,0374x + 14,447$	0,9072

\* R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação; 1 NEF: Número de estipes formados; 2 NAF: Número de apotécios formados.

Nota-se que em todos os isolados utilizados menor quantidade de apotécios em relação ao número de estipes produzidos, com maior evidencia nos isolados 1 e 5. O S1 na concentração de 250 mL.100 L<sup>-1</sup>, produziu 45, 58 estipes (NEF), e de 15,08 apotécios (NAF). Para S5, na mesma concentração houve a formação de 25,17 estipes, e de 5,75 apotécios. No entanto, apesar não inibir a formação das estruturas reprodutivas, há a redução da formação de apotécios, ou seja, a quantidade de ascósporos liberados é menor, diminuindo assim a ocorrência da doença. Abawi e Grogan (1975) consideram os ascósporos liberados, como fonte primaria de infecção.

Frente ao problema no controle de fitopatógenos, uma estratégia atual da agricultura vem sendo buscar métodos alternativos para o controle de doenças e pragas, que visem causar menores danos ao ambiente e a saúde humana (ABREU, 2014). Entretanto, para resultados mais conclusivos, necessita-se que sejam realizados mais experimentos em laboratório quanto em campo, pois um dos fatores que pode contribuir para o sucesso ou fracasso do controle é a variabilidade genética dos isolados de *S. sclerotiorum*, a qual confere diferença de sensibilidade à ação do produto.

#### 4 CONCLUSÕES

O produto comercial a base de óleo de laranja (*Citrus sinensis*) nas concentrações de 200 mL.100 L<sup>-1</sup> e de 250 mL.100 L<sup>-1</sup> apresentaram atividade antifúngica no crescimento micelial do patógeno e na produção de estruturas resistência, conhecidas como escleródios.

O óleo essencial da casca da laranja não proporcionou efeito inibitório da germinação carpogênica dos cinco isolados utilizados de *S. sclerotiorum*.

## 5 REFERÊNCIAS

- ABAWI, G.S.; GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v.69, n.8, p.899-904, 1979.
- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, n. 1, p. 265-267, 1925.
- ABREU, M.G.P. de. et al. Efeito fungitóxico de óleos essenciais de palmeiras amazônicas sobre *Colletotrichum* sp. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 2014.
- ALMEIDA, A.; SEIXAS, C. (Ed.). **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Londrina: Embrapa Soja. p.73-104. 2010.
- AL-REZA, S. M.; RAHMAN, A.; AHMED, Y.; KANG, S. C. Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, Calif., v. 96, p. 86-92, 2010.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can. Journal Plant Pathology**. v.16, p. 93-108, 1994.
- BRASIL. DECRETO nº 6.323: **Produção orgânica no Brasil de 27 de dezembro de 2007**.
- BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CRATO, F.F. do. **Quantificação de escleródios e germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos da cultura da soja tratada química e biologicamente**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia.
- DELGADO, G. V. et al. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. *in vitro*. In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**, 10., 2007, Brasília. Resumos... Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 38, n.2, p. 109-112 , 2014. Disponível em: ISSN 1413-7054. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.

GARCIA, R.A. et al. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v.28, n.1, p.48-57, 2012a.

GARCIA, R. Á. et al.. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em meio de cultura= Production of sclerotia on *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary in culture media. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, 2012b.

GOMES, E.V. et al. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops. In: **Brazil Journal of phytopathology**, v. 159, n. 2, p. 94-99, 2011.

GOMES, M. de S. **Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero Citrus**. 2011. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras.

GÖRGEN, C.A. **Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* “1306”**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás.

GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; SOUSA, P.E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S.S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, p. 464-472, 2011.

LORENZETTI, E. R., MONTEIRO, F. P., SOUZA, P. E., SOUZA, R. J., SCALICE, H. K., DIOGO, J. R., & PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 619-627, 2011.

MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, p. 382-387, 2007.

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

PAVAN, M. A. et al. Doenças da alface (*Lactuca sativa*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, cap. 6, p.27-33, 2005.

RASOOLI, I. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, n.17, p. 359-364, 2006.

REIS, E.M.; et al. Ciclo do mofo branco. **Revista Plantio Direto**, v. 122, p. 24-27, 2011.

RIBEIRO, G.C. **Sensibilidade a fungicidas e caracterização molecular de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum***. Rio Verde, 2012. Dissertação (Mestrado) - FESURV - Universidade de Rio Verde.

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, n. 2, p. 124-128, 2007.

SANTOS, A. C. A. dos. et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira. Farmacognosia**, v. 20, p. 154-159, 2010.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 587-593, 2006.

SILVA, F.P.M. da. **Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas**. 2007. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal da Grande Dourados.

SILVA, I.D. et al. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2005.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia ciência & desenvolvimento**, v. 11, n. 3, p. 16-21, 1999.

TEIXEIRA, M. L. et al. *Citrumelo Swingle*: Caracterização química, atividade antioxidante e antifúngica dos óleos essenciais das cascas frescas e secas. **Magistra**, v. 24, p. 194-203, 2012.

TOWNSEND, B.B.; WILLETTS, H.J. The development of sclerotia of certain fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 37, n. 3, p. 213-221, 1954.

ZANELLA, C. de S. et al. Activity of plant extracts on the carpogenic germination and mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-8, 2015.