



EMI RAINILDES LORENZETTI

**CONTROLE DE DOENÇAS DO
MORANGUEIRO COM ÓLEOS ESSENCIAIS E
Trichoderma spp.**

LAVRAS – MG

2012

EMI RAINILDES LORENZETTI

**CONTROLE DE DOENÇAS DO MORANGUEIRO COM ÓLEOS
ESSENCIAIS E *Trichoderma* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Dr. Paulo Estevão de Souza

Coorientador

Dr. Rovilson José de Souza

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Lorenzetti, Emi Rainildes.

Controle de doenças do morangueiro com óleos essenciais e
Trichoderma spp. / Emi Rainildes Lorenzetti. – Lavras : UFLA,
2012.

106 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Paulo Estevão de Souza.

Bibliografia.

1. *Botrytis cinerea*. 2. *Colletotrichum* sp. 3. Produtos orgânicos.
4. Controle alternativo. 5. Controle biológico. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.4

EMI RAINILDES LORENZETTI

**CONTROLE DE DOENÇAS DO MORANGUEIRO COM ÓLEOS
ESSENCIAIS E *Trichoderma* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 06 de março de 2012

Dr. André Narvaes da Rocha Campos	IFSEMG
Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Dr. Rovilson José de Souza	UFLA
Dra. Carolina Valeriano	UFLA

Dr. Paulo Estevão de Souza

Orientador

Dr. Rovilson José de Souza

Coorientador

LAVRAS – MG

2012

DEDICO

A minha querida mãe Fumie, por todo o carinho e força nos momentos que pode estar comigo neste caminho. Estarás para sempre em meu coração!!!

OFEREÇO

Aos “sábios e artistas”

“No convívio com sábios e artistas facilmente nos enganamos no sentido oposto: não é raro encontrarmos por detrás dum sábio notável um homem medíocre, e muitas vezes por detrás de um artista medíocre - um homem muito notável.”

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de cursar o doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Paulo Estevão de Souza pela orientação.

Ao professor Rovilson José de Souza pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Edson Ampélio Pozza pelo apoio e confiança.

A todos os funcionários do DFP, em especial a Eliane e Vladimir pelo auxílio em todos os passos dos experimentos e aos funcionários do Setor de Olericultura, Jozimar, Miltinho e em especial ao Sr. Pedro, por todo o empenho e disposição em auxiliar nas etapas dos experimentos.

A meu pai Rui, a Eli, Rodrigo e família pelo incentivo e carinho.

Ao Rodrigo de Oliveira pela paciência e companheirismo.

Aos meus queridos amigos de Botucatu, Danila, Simone, Thaise, Adriana, Rosilaine, Andréa e Adilson por todo o incentivo e bons momentos de descontração e amizade, que mesmo de longe sempre estiveram presentes. E aos novos amigos de Lavras Juracy, Nara, Rodolfo, Fernanda, Jader, Valquíria, Amália, Fabrícia e todos os outros grandes companheiros de caminhada.

Aos meus queridos estagiários, Henrique (Maritak), Rubens, Myrian e Lorena por toda a ajuda nos experimentos, amizade e confiança.

Aos amigos da Epidemio, Leandro, Marília e Fernando, pela amizade, incentivo e muitas horas de risadas.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

A cultura do morangueiro é severamente acometida por várias doenças, dentre elas a antracnose e o mofo cinzento. Apresenta sérios problemas também em relação a resíduos de pesticidas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de formas de controle para as principais doenças do morangueiro, mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) e antracnose (*Colletotrichum* sp.). Doze óleos essenciais foram testados, alecrim (*Rosmarinus officinalis*), menta (*Mentha piperita*), lavandim (*Lavandula hybrida*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), canela (*Cinnamomum zeilanicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Corymbia citriodora*), citronela (*Cymbopogon nardus*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), palmarosa (*Cymbopogon martini*), laranja doce (*Citrus sinensis* var. *dulcis*) e tangerina (*Citrus nobilis* var. *tangerinae*) e analisados quanto a composição química em cromatógrafo a gás. Posteriormente foram realizados experimentos *in vitro* com a ação de óleos essenciais e do antagonista *Trichoderma*. Os óleos que apresentaram os melhores resultados foram selecionados e com eles realizados experimentos *in vivo* em laboratório (folhas recortadas), em campo e em pós-colheita (com três metodologias diferentes, imersão, volatilização e recobrimento por fécula). Nos testes *in vitro* e em folhas recortadas, a concentração 1000 ppm foi selecionada, bem como os óleos de canela, capim-limão e menta; para posteriores testes em campo. Alguns dos antagonistas empregados mostraram-se favoráveis ao controle dos patógenos. Para os testes em campo foram empregadas duas cultivares de morangueiro Aromas e Oso Grande. Para Aromas a produção foi influenciada pela aplicação dos óleos essenciais, possivelmente em decorrência do florescimento e/ou polinização terem sido afetados. Para Oso Grande não houve diferenças quanto à produção. As variáveis analisadas quanto às características químicas dos frutos e a presença de podridões não foram influenciadas pela aplicação dos óleos. Para os tratamentos dos frutos em pós-colheita apenas a imersão apresentou redução das podridões para o óleo de eucalipto. Houve descoloração de frutos com aumento da incidência para os óleos de canela e capim-limão. Tratamentos por volatilização e com recobrimento por fécula, não se mostraram eficientes. Tratamentos com óleos essenciais mostram potencial *in vitro*, *in vivo* carecem de mais pesquisas para que possam ser efetivamente empregados em campo.

Palavras-chave: *Botrytis cinerea*. *Colletotrichum* sp. Produtos orgânicos. Controle alternativo. Controle biológico.

ABSTRACT

The strawberry crop is severely affected by various diseases, like anthracnose and gray mold. A serious problem in this crop is pesticide residues. The aim of this work was evaluate the use of different controls to the biggest strawberry diseases, gray mold (*Botrytis cinerea*) and anthracnose (*Colletotrichum* sp.). Twelve essential oils were tested, rosemary (*Rosmarinus officinalis*), peppermint (*Mentha piperita*) lavender (*Lavandula hybrida*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), cinnamon (*Cinnamomum zeilanicum*), clove (*Syzigium aromaticum*), eucalyptus (*Corymbia citriodora*), citronella (*Cymbopogon nardus*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), palmarosa (*Cymbopogon martini*), orange (*Citrus sinensis* var. *dulcis*) and tangerine (*Citrus nobilis* var. *tangerinae*), which were analyzed for chemical composition in the gas chromatograph. After, experiments were performed in vitro conditions to analyze the effect of essential oils and the antagonist *Trichoderma*. The oils that showed the best results in this experiments were selected and performed in vivo experiments in laboratory (cut leaves test), field and post-harvest (with three different methodologies, immersion, starch coating and vaporization). Using in vitro tests and cut leaves test, 1000 ppm concentration was selected, as well as cinnamon, lemon grass and mint essential oils; for field testing. Some of antagonists employed were favorable to pathogens control. For field tests were used Oso Grande and Aromas strawberry cultivars. For Aromas, production was influenced by essential oils applications, likely due the flowering and/ or pollination has been affected. To Oso Grande there were no differences in the production. The chemical characteristics variables analyzed for fruits and decay presence were not affected by oils applications. For post-harvest treatment just immersion with eucalyptus essential oil decreased fruit rots. There was fruit discoloration with incidence increase for cinnamon and lemon grass oils. Treatments with volatilization and starch coating were not efficient. Treatments with essential oils showed potential in vitro, in vivo require further research, then, they can be effectively employed in the field.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., organic products, alternative control, biological control.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Aspectos gerais sobre a cultura do morango.....	11
2.2	Produção mundial e nacional.....	12
2.3	Sustentabilidade em sistemas de produção agrícola.....	14
2.4	Controle biológico de doenças de plantas	17
2.4.1	Óleos essenciais no manejo de doenças	18
2.5	Doenças em morangueiro.....	26
2.5.1	Mofo cinzento do morangueiro.....	28
2.5.2	Antracnose do morangueiro	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Obtenção dos óleos essenciais e identificação de componentes químicos	33
3.2	Obtenção dos isolados de <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum gloesporioides</i> e <i>Colletotrichum acutatum</i>	34
3.2.1	Sensibilidade de isolados de <i>Botrytis cinerea</i> a fungicidas.....	35
3.3	Experimentos <i>in vitro</i>	36
3.3.1	Bioatividade de óleos essenciais no crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum gloesporioides</i> e <i>Colletotrichum acutatum</i>	37
3.3.2	Produção de conídios e germinação de conídios de <i>Botrytis cinerea</i>	38
3.3.3	Bioatividade de componentes voláteis de óleos essenciais no crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i>	40
3.3.4	Manejo de resistência de <i>Botrytis cinerea</i> com óleos essenciais.....	41
3.3.5	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. à <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Colletotrichum acutatum</i>	42
3.4	Testes <i>in vivo</i> para o controle de <i>Botrytis cinerea</i> do morangueiro....	44
3.5	Óleos essenciais no controle de patógenos do morangueiro em campo	46
3.6	Pós-colheita de frutos de morangueiro sob ação de óleos essenciais .	48
3.7	Óleos essenciais no controle de patógenos do morangueiro em pós- colheita	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	Identificação de componentes químicos dos óleos essenciais	53
4.2	Sensibilidade de isolados de <i>Botrytis cinerea</i> a fungicidas	56
4.3	Experimentos <i>in vitro</i>	59
4.3.1	Bioatividade de óleos essenciais no crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum gloesporioides</i> e <i>Colletotrichum acutatum</i>	59

4.3.2	Produção de esporos e germinação de conídios de <i>Botrytis cinerea</i>	65
4.3.3	Bioatividade de componentes voláteis de óleos essenciais no crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i>	68
4.3.4	Manejo de resistência de <i>Botrytis cinerea</i> com óleos essenciais.....	69
4.3.5	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. à <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Colleotrichum acutatum</i>	71
4.4	Testes <i>in vivo</i> para o controle de mofo cinzento do morangueiro.....	77
4.5	Óleos essenciais no controle de patógenos do morangueiro em campo	79
4.6	Pós-colheita de frutos de morangueiro sob ação de óleos essenciais .	83
4.7	Óleos essenciais no controle de patógenos do morangueiro em pós-colheita	85
5	CONCLUSÕES	88
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch. Ex. Rozier) é cultivado em várias regiões do mundo principalmente pelas características alimentares, ligadas às questões nutricionais e visuais. Desenvolve-se melhor em áreas temperadas, nas quais apresenta produções máximas, como é o caso dos maiores produtores mundiais, Estados Unidos e Espanha.

Por meio de estudos envolvendo melhoramento e consequente desenvolvimento de novas cultivares de fotoperíodo neutro e menos exigentes em frio, mais adaptadas ao clima tropical, as fronteiras para o cultivo foram expandidas. Promovendo assim, o desenvolvimento do cultivo no Brasil. A região Sul do Estado de Minas Gerais apresentando condições climáticas favoráveis, ligadas às altas altitudes, promovendo microclima favorável, tornou esta região a maior produtora do país.

Apesar de poucos dados, estima-se que a produção mundial da fruta em 2009 foi de 4.178.152 t em uma área de 254.523 ha. No Brasil, a produção nacional está em torno de 105 mil t, em quatro mil hectares. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional, com cerca de 40 mil t /ano, o equivalente a 40% da produção nacional (ANTUNES, 2010a; 2010b).

A cultura apresenta alta demanda de mão de obra, geralmente familiar, cultivo intensivo concentrado em determinada época do ano e alto valor agregado à produção. A atividade na maioria das vezes é realizada em propriedades pequenas a médias, justificando, além da importância econômica, a importância social da cultura.

Um dos grandes problemas limitantes para a cultura é o manejo fitossanitário. Com o cultivo intensivo e condições microclimáticas ideais existe favorecimento para doenças. Dentre essas doenças, as fúngicas predominam,

notadamente antracnose e mofo cinzento. Ambas problemáticas no campo quanto em pós-colheita, comprometendo a vida de prateleira do produto.

Pela necessidade de aplicações frequentes de agroquímicos, fungicidas e inseticidas, conseqüentemente gerando altos índices de contaminação do produto comercializável, o estabelecimento de práticas menos agressivas torna-se imperativo.

Ainda são escassos trabalhos de pesquisa visando o estabelecimento desses manejos menos agressivos. Apesar de apresentar grande potencial a agricultura orgânica, de uma forma geral, esbarra na falta de subsídios quanto ao manejo de pragas e doenças.

Estudos visando práticas menos agressivas são necessários, dentre esses se enquadram trabalhos envolvendo o desenvolvimento de novas formulações, como de fungicidas, passíveis de serem empregados no sistema orgânico.

O controle biológico de doenças atende a essas necessidades e vem crescendo em importância na agricultura. Além do uso de agentes de controle biológico, como os clássicos *Trichoderma* e *Clonostachys rosea*, é crescente o uso de subprodutos advindos do metabolismo secundário de plantas, como os óleos essenciais atuando como biocontroladores de doenças.

Diante do exposto objetivou-se: i) avaliar a utilização de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle de mofo cinzento e antracnose do morangueiro, ii) avaliar metodologias de aplicação de óleos essenciais em frutos de morangueiro, iii) avaliar a influência de óleos essenciais nas características de pós-colheita, iv) avaliar a utilização de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de mofo cinzento e antracnose do morangueiro, v) avaliar o uso de óleos essenciais para isolado resistente de *B. cinerea*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais sobre a cultura do morango

O morango cultivado comercialmente é um híbrido resultante do cruzamento das espécies *Fragaria chiloensis* (L.) Duch e *F. Virginiana* Duch. formando a espécie *Fragaria x ananassa* Duch. Ex. Rozier (GALLETTA ; BRINGHURST, 1990).

Inicialmente apreciado pelo valor ornamental e medicinal na Europa, adaptou-se as mais diversas condições climáticas, sendo cultivado em todo o mundo (SILVA et al., 2007). É consumido principalmente *in natura*, devido às peculiaridades que apresenta como sabor, coloração, aroma e bom valor nutricional (SANTOS et al., 2007). Quanto às características nutricionais, o morango possui 92,8% de água, 2,3% de fibras e 39 calorias em 100 g de frutas, vitaminas B1, B2 e B5 e C além de outros elementos, como potássio, cálcio, sódio, ferro e fósforo (LUENGO et al., 2000).

É uma planta herbácea, rasteira e perene, porém, cultivada como anual, formando pequenas touceiras. O sistema radicular é muito superficial e fasciculado, com a maior parte das raízes concentradas nos primeiros cinco centímetros de solo (FILGUEIRA, 2003). Com o desenvolvimento da coroa há formação das gemas, que podem originar coroas secundárias, estolhos e inflorescências, em função do fotoperíodo exigido por cada cultivar (SILVA et al., 2007).

Os frutos aquênios são conhecidos popularmente como sementes (pontos pretos na porção carnosa). A porção carnosa é resultante do desenvolvimento do receptáculo floral, devido à auxina presente nas sementes (SILVA et al., 2007). Assim, o pseudofruto carnoso de coloração vermelho-vivo é constituído do receptáculo floral, sendo os frutos aquênios de interesse para melhoristas por conterem as sementes botânicas (FILGUEIRA, 2003).

Diferente do que é empregado no Mercado, o morangueiro apresenta um fruto de alta perecibilidade não climatério, necessitando ser colhido na sua máxima maturação, para que atinja as características desejadas de cor, textura e aroma (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008).

O florescimento é dependente de fatores ambientais, principalmente temperatura e fotoperíodo, e fatores internos da planta (BUENO et al., 2002). A temperatura diurna é um fator crítico para a frutificação, quando elevada os frutos formados apresentam pouco sabor, alta acidez e pouco firmes, sendo a temperatura ideal no início da manhã de 10°C. O fotoperíodo influencia na frutificação, dias curtos induzem a fase reprodutiva enquanto dias longos a vegetativa. A adaptação de cultivares está intimamente relacionada a esses dois fatores, temperatura e fotoperíodo (FILGUEIRA, 2003).

Um impedimento para a produção de morango no país é a grande incidência de doenças e pragas, resultando em várias aplicações de defensivos agrícolas, principalmente inseticidas-acaricidas e fungicidas, levando a problemas quanto ao acúmulo de resíduos no ambiente, nos frutos comercializados e para os aplicadores.

2.2 Produção mundial e nacional

A produção mundial do fruto em 2009 foi de 4.178.152 t em uma área de 254.523 ha. Os maiores produtores mundiais, em 2008, são os Estados Unidos com uma produção de 1.484.101 t, seguido da Espanha com uma produção de 281.240 t (FAO, 2011). O Canadá enquadra-se como principal importador e a Espanha como principal exportador (AGRIANUAL, 2008). Quanto aos maiores consumidores estão os Estados Unidos, China, Japão, Canadá e Itália (AGRIANUAL, 2008).

Para o Brasil existem poucas informações disponíveis quanto a dados de produção. Estima-se que a produção nacional esteja em torno de 105 mil toneladas, em 4 mil hectares. Minas Gerais é o maior produtor nacional de morangos, segundo o Instituto Brasileiro de Frutos (IBRAF), com cerca de 40 mil toneladas/ano, o equivalente a 40% da produção nacional, seguido por São Paulo com 29 mil toneladas/ano e depois, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo e Rio de Janeiro, respectivamente (ANTUNES, 2010a; 2010b).

Ainda existem dados de importação de morango congelado processado para indústria na ordem de 977 t no ano de 2007, tendo como principais exportadores a Argentina (690 t), China (149 t) e Chile (138 t) (AGRIANUAL, 2009).

A produtividade média dos principais produtores é de 34 t.ha⁻¹ em São Paulo e no Espírito Santo, 32,7 t.ha⁻¹ para o Rio Grande do Sul, 21,3 t.ha⁻¹ no Paraná e 25,2 t.ha⁻¹ para Minas Gerais (ANTUNES et al., 2005).

Em 2003 a área cultivada em Minas Gerais era de aproximadamente 1196,5 ha com uma produção estimada de 40.561,3 t. Os principais municípios produtores são Pouso Alegre com uma área de 300 ha, Estiva, com 250 ha e Bom Repouso, 240 ha (CARVALHO et al., 2006). Segundo estimativas de extensionistas da Emater – MG, os municípios de Cambuí, Senador Amaral e Tocos do Moji também merecem destaque em área plantada com morangueiro.

Na região Sul de Minas Gerais a cultura vem expandindo pelos bons resultados econômicos, localização privilegiada com proximidade de grandes centros consumidores (Campinas, São Paulo, Belo Horizonte, Rio de Janeiro), o que estimula o aumento de área plantada e adesão de novos produtores (DUARTE FILHO, 2006).

Para o Brasil, a produção *in natura* é feita em pequenas propriedades com base na agricultura familiar (BORTOLOZZO et al., 2007). Também para o

Estado de Minas Gerais a importância social e econômica da cultura do morango evidencia-se por ser a principal fonte de renda para a maioria dos produtores classificados como agricultores familiares e que utilizam mão de obra familiar (CARVALHO, 2006).

2.3 Sustentabilidade em sistemas de produção agrícola

O termo desenvolvimento sustentável foi inicialmente utilizado em 1987 pela Comissão Mundial de Meio Ambiente e Desenvolvimento da Organização das Nações Unidas (ONU), representando o desenvolvimento capaz de suprir as necessidades da geração atual, sem comprometer a capacidade de atender as necessidades das futuras gerações. Relacionando esse conceito com a agricultura, tem-se que agricultura sustentável se mantém durante um longo período de tempo, sendo economicamente viável, ambientalmente segura e socialmente justa (LICHTFOUSE et al., 2009).

Em relação à aplicação de defensivos na agricultura, grande parte desses é perdida nas aplicações, não atingindo seus alvos e sendo levados para reservatórios de água e para o solo. Essas perdas devem-se as tecnologias de aplicação ineficientes, principalmente quanto ao momento e as formas empregadas para a aplicação (BETTIOL; GHINI, 2003).

O uso desses agroquímicos na cultura e a contaminação das frutas são alvo de constante preocupação para a saúde pública, gerando a necessidade de realização da avaliação toxicológica e do estabelecimento de parâmetros de segurança relativos à sua utilização (MATTOS, 2004).

A introdução de cultivares e a adoção de novas práticas culturais envolvendo tratamento de solo, cultivo protegido, irrigação por gotejamento, manejo nutricional e fitossanitário e cuidados pós-colheita, têm modificado o

perfil da atividade incrementando aspectos de segurança alimentar e rentabilidade (ASSIS, 2004).

O mercado mundial, consumidor de frutas *in natura* ou processadas, demanda procedimentos fitossanitários rigorosos para a importação desses produtos, priorizando a qualidade e o meio ambiente (MATTOS, 2004). Além disso, dentre as novas tendências, é necessário controle e registro sobre todo o sistema de produção, incluindo análise de resíduos de agrotóxicos e estudos sobre impacto ambiental da atividade, ou seja, é necessária a rastreabilidade de toda a cadeia produtiva (FACHINELO et al., 2008).

Com incentivos governamentais estabelecidos nos últimos anos, principalmente a partir da Instrução Normativa nº 007, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, publicada no Diário Oficial da União em 19/05/1999 (BRASIL, 1999) e pela aprovação da Lei de Orgânicos nº 10831 em dezembro de 2003, motivada pela organização do setor produtivo, a produção orgânica cresceu em importância no cenário nacional (SOUZA; RESENDE, 2006). Esta lei foi regulamentada pelo Decreto nº 7048 de dezembro de 2009, estendendo o prazo para adequações dos agentes das redes de produção orgânica até 31 de dezembro de 2010. Apesar das dificuldades em atender as regulamentações impostas pela legislação o setor continua avançando.

O manejo ecológico de doenças baseia-se geralmente no princípio da prevenção, melhorando as condições do solo, aumentando a biodiversidade, empregando práticas de manejo diferenciadas (SOUZA; RESENDE, 2006). Os sistemas alternativos enfatizam o manejo das relações biológicas, como aquelas existentes entre praga e predadores e processos naturais (BETTIOL; GHINI, 2003).

Em períodos de conversão da agricultura convencional para agricultura orgânica e em determinadas condições climáticas, algumas doenças podem causar sérios problemas, com perdas significativas, sendo necessárias

intervenções com aplicações de produtos naturais permitidos e regulamentados para agricultura orgânica (BOFF, 2001). Dentre esses produtos incluem-se extratos vegetais, biofertilizantes, própolis, óleos essenciais, preparados homeopáticos, óleos vegetais, preparados fúngicos, bacterianos ou viróticos (Anexo IV da Portaria nº 422 de maio de 2008). Recentemente, em 25 de maio de 2011 entrou em vigor a Instrução Normativa Conjunta nº 1 objetivando facilitar o registro de produtos para agricultura orgânica.

Existe uma atual preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e contaminação da cadeia alimentar, levando a uma alteração do cenário agrícola, surgindo mercados de alimentos livres de agrotóxicos (orgânicos) ou com selos que garantam o uso adequado dos agrotóxicos (como o PIF) (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Com o aumento da demanda por produtos rastreáveis e de maior qualidade, conseqüentemente com maior valor agregado, novas tecnologias são necessárias para que o manejo fitossanitário possa ser feito de uma forma menos agressiva, tanto em termos ambientais quanto econômicos e sociais (DAYAN et al., 2009).

O uso de produtos naturais demonstra-se como uma alternativa ao uso de fungicidas convencionais, que apresentam muitas vezes problemas com resistência de fungos aos fungicidas (CHANG et al., 2008).

Produzir em sistema orgânico exige técnicas mais aprimoradas, devido à necessidade da integração interdisciplinar de conteúdos, o que muitas vezes foge do sistema hoje utilizado nas academias de Agronomia. No atual contexto da produção agrícola, com o uso de agroquímicos, a prática agrícola orgânica torna-se um desafio para técnicos que possuem uma formação tipicamente voltada à agricultura convencional (SEGHESE, 2006).

2.4 Controle biológico de doenças de plantas

Apesar das muitas definições, o controle biológico visa o equilíbrio do agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno não sofra danos significativos em função da ação dos organismos não patogênicos do sistema.

Doença, no contexto do controle biológico, é mais do que a clássica definição de uma interação do patógeno com o hospedeiro, influenciada pelo ambiente; trata-se do resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não patógenos presentes no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro (BAKER; COOK, 1974).

O uso de controle biológico em pragas e doenças evoluiu de forma diferenciada. Para as pragas o controle biológico é antigo, iniciado com a exploração de criações como as abelhas. Por volta dos séculos XVIII e XIX passaram a ser empregados os primeiros bioinseticidas e nas épocas atuais, com a engenharia genética, são desenvolvidas plantas transgênicas portadoras de genes de bactérias biocontroladoras (*Bacillus thuringiensis*). Quanto às plantas, apenas no século XX, por volta de 1920 iniciaram-se os estudos com fungos antagonistas. Apenas em 1970, criou-se uma base sólida conceitual e científica sobre o controle microbiano de doenças (LOPES, 2009).

Uma imensa variedade de formas de controle biológico estão disponíveis, contudo, o seu desenvolvimento e efetiva adoção requerem um entendimento ótimo das relações das plantas, pessoas e ambiente (PAL; GARDENER, 2006).

Dentre as técnicas empregadas no controle biológico, o uso de antagonistas é o mais difundido. E entre os antagonistas, o mais conhecido é o fungo *Trichoderma*. Esse fungo apresenta distribuição ampla, ocorrendo no

mundo inteiro em quase todos os tipos de solos e em outros “habitats” naturais que possuam matéria orgânica. Algumas espécies são frequentemente encontradas na casca ou descascado na madeira (SAMUELS, 1996).

Espécies de *Trichoderma* spp. são consideradas eficientes antagonistas no controle de uma série de fungos fitopatogênicos, atuando tanto pela produção de compostos bioativos, metabólicos voláteis e não voláteis, como também pelo hiperparasitismo e competição por nutrientes, espaço e oxigênio (CAMPOROTA, 1985; CLAYDON et al., 1987; PAPAVIDAS, 1985; SAMUELS, 1996). Além disso, é conhecida a capacidade de promoção de crescimento por parte desse antagonista. Essa capacidade reflete-se no crescimento em plantas, na germinação de sementes e na produção de flores (MELO, 1996).

A produção de metabólitos tóxicos por espécies de *Trichoderma* spp. foi descrita inicialmente por Weindling (1934). As espécies desse gênero produzem exoglucanases, endoglucanases, celobiasas e quitinases, enzimas importantes na degradação da parede celular de fungos fitopatogênicos. A capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e até mesmo entre isolados da mesma espécie (PAPAVIDAS, 1985).

Além do uso de antagonistas, produtos advindos do metabolismo secundário de plantas também vêm sendo empregados no biocontrole de doenças.

2.4.1 Óleos essenciais no manejo de doenças

Objetivando reduzir o impacto dos efeitos promovidos pelos agrotóxicos e melhorando a qualidade dos alimentos produzidos, visando uma agricultura sustentável, buscam-se novas formas de proteção de plantas, dentre elas o emprego de extratos, hidrolatos e óleos essenciais de plantas medicinais, caldas,

preparados homeopáticos, biofertilizantes (STANGARLIN, 2007; BOFF, 2008). Trabalhos com diversas espécies vegetais empregando formas alternativas de controle de doenças e pragas são realidades dentro da prática agroecológica de produção.

Os agentes de controle de doenças utilizados atuam tanto com ação de contato direto sobre os microrganismos quanto como indutores de resistência (MORAES, 1992; STANGARLIN, 2007). Os agentes elicitores são compostos que incluem substâncias como enzimas, peptídeos, ácidos graxos, carboidratos, proteínas e componentes de parede (KEEN et al., 1983; HAHN, 1996). Os indutores de resistência podem atuar diretamente na síntese de fitoalexinas que constituem compostos antimicrobianos, de baixo peso molecular, (HAMMERSCHMIDT, 2001), resultantes de metabolismo secundário, acumulados a partir da resposta de plantas ao estresse ocasionado por fatores biológicos, físicos ou químicos, que podem reduzir ou suprimir a atividade do agente patogênico (PURKAYASTHA, 1995).

Vários produtos vêm sendo testados para diferentes culturas com a finalidade de induzirem algum tipo de defesa da planta. Dentre aqueles originados de plantas medicinais e cogumelos, pode-se citar o eucalipto utilizado por Bonaldo et al. (2004), que demonstrou resultados positivos como indutor de resistência a *Colletotrichum lagenarium* em pepino. Silva et al. (2007b) empregaram positivamente extratos de cogumelos como indutores de resistência contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro.

Outros produtos que vêm sendo empregados para o controle de doenças, apesar de serem suspeitos a atuarem como indutores de resistência, mas também atuam, comprovadamente, como produtos de contato, são os óleos essenciais (BONALDO et al., 2004).

O termo óleo essencial designa líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, compostos por misturas de substâncias

orgânicas imiscíveis em água, extraídos de plantas por processos específicos, sendo o mais simples por arraste de vapor d'água (CRAVEIRO, 1981).

Apresentam-se como substâncias com constituintes complexos e variáveis, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos de enxofre, dentre os quais destacam-se aqueles de baixo peso molecular, como os monoterpenos e sesquiterpenos. Possuem características peculiares odoríferas, lipofílicas, líquidas e voláteis, conhecidos também como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, apresentam-se em diferentes concentrações, ocorrendo sempre um composto majoritário e outros em menores quantidades (SIMÕES; SPITZER, 2000). Podem ser encontrados em células especiais das plantas como glândulas, tricomas glandulares, ductos de óleo e resina, situados em qualquer parte da planta (PENGELLY, 2004).

Tais óleos são raramente encontrados em gimnospermas (com exceção para as coníferas) e em angiospermas monocotiledôneas (com exceção de gramíneas - especialmente espécies de *Cymbopogon* e *Vetiveria*) e zingiberáceas (espécies de *Alpinia* e *Curcuma*). Em dicotiledôneas os óleos essenciais são abundantes, principalmente em famílias como *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Myristicaceae*, *Piperaceae* e *Rutaceae* (SIMÕES; SPITZER, 2000).

De uma forma geral, os terpenoides e os fenilpropanoides são os principais componentes dos óleos essenciais. Os terpenos são classificados segundo as unidades de isopreno (C_5H_8) que os constituem, sendo assim os terpenoides presentes em óleos essenciais enquadram-se como mono e sesquiterpenos (HARBORNE et al., 1999). Os fenilpropanoides são compostos orgânicos de um anel benzênico ligado com três átomos de carbono (PENGELLY, 2004).

Como responsáveis pelo efeito dos óleos essenciais estão um ou mais compostos do óleo, geralmente um composto majoritário. Muitos trabalhos com diferentes patossistemas relatam a eficiência no controle de patógenos, tanto em relação a óleos essenciais como em componentes de óleos essenciais.

Abreu (2006), testando óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Syzygium aromaticum* (cravo), *Eucalyptus citriodora* (eucalipto), *Melaleuca alternifolia* (tea-tree) e *Mentha piperita* (hortelã) comprovou o efeito desses agentes no controle de *Alternaria solani*, tanto em condições *in vitro* como em condições de campo, sendo que a doença promovida por esse fungo a pinta-preta do tomateiro, enquadra-se como um dos piores problemas fitossanitários na cultura do tomateiro.

Em outro trabalho, Anaruma et al. (2010) testando 28 óleos essenciais, constataram a atividade de 15 deles contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., agente da antracnose em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg).

Da mesma forma para soja, a ferrugem asiática considerada um dos piores problemas fitossanitários da cultura da soja, pode ter sua intensidade reduzida em casa de vegetação e a germinação de seu agente etiológico, *Phakopsora pachyrizi*, também ser reduzida *in vitro* com óleos essenciais de *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora), *Cymbopogon nardus* (citronela), *Azadirachta indica* (nim) e *Thymus vulgaris* (tomilho) (MÉDICE et al., 2007).

Para *Botrytis cinerea*, Wilson et al. (1997) testaram 345 extratos de plantas e 49 óleos essenciais em relação à ação antifúngica. De todos os óleos testados, os de palma-rosa (*Cymbopogon martini*), tomilho (*Thymus zygis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) apresentaram melhores resultados na inibição do fungo.

Para diversas culturas, Schwan-Estrada et al. (2005) citam estudos com plantas como arruda (*Ruta graveolens*), alho (*Allium sativum*), alecrim

(*Rosmarinus officinalis*), cúrcuma (*Curcuma longa*), cavalinha (*Equisetum* sp.), mil-folhas (*Achillea millefolium*) entre outras, controlando fitopatógenos.

Para podridão gomosa em Cucurbitáceas, Fiori *et al.* (2000) utilizando extratos vegetais e óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Ageratum conyzoides* e *Achillea millefolium* observaram a inibição do crescimento micelial e da germinação dos esporos de *Didymella brioniae*, agente etiológico da podridão gomosa.

Dentre os óleos essenciais utilizados neste trabalho, a citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.) apresenta óleo essencial rico em citronelal (cerca de 40%), além de pequenas quantidades de geraniol, citronelol e ésteres. O citronelol é excelente aromatizante de ambientes e repelente de insetos, além de apresentar ação antimicrobiana local e acaricida (MARCO *et al.*, 2007).

Outro óleo essencial que apresenta efeitos comprovados é a menta (*Mentha piperita* L.). A menta apresenta um dos óleos essenciais mais conhecidos, do qual é extraído o mentol, componente principal, empregado em medicamentos, cosméticos e alimentos. Cita-se em sua composição o mentol, mentona, ésteres metílicos, terpenos, cineol, tantino e princípio amargo (OLIVEIRA; AKISUE, 2003). Originária da Europa e trazida na época da colonização do Brasil, é amplamente cultivada em jardins e quintais. Em relatos etnobotânicos, é empregada como antibacteriana, antifúngica e anti-helmíntica (LORENZI; MATTOS, 2008). O mentol é um dos principais constituintes do óleo essencial, correspondendo a cerca de 40% do total de óleo essencial, sendo o componente responsável pelas características aromatizantes e sensação de refrescância. Os isômeros do mentol são encontrados como ésteres acetato (DAVID, 2007).

Óleos essenciais de plantas da família *Lamiaceae*, mesma família botânica da menta, orégano (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii*), lavanda (*Lavandula stoechas* L. var. *stoechas*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.),

demonstraram efeito no controle de *B. cinerea* em tomateiro, sendo o óleo de orégano o mais eficiente (SOYLU et al, 2010).

Outro óleo com importantes relatos é o óleo essencial de cravo. *Syzigium aromaticum* L., originário da Índia, conhecido popularmente como cravo, apresenta como um dos principais componentes de seu óleo essencial o eugenol. Ranashinge *et al* (2002), testando esse óleo essencial, comprovaram sua ação antifúngica contra fungos de pós-colheita isolados de banana, sendo estes *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium proliferatum*. Pereira et al. (2008a) testando o óleo essencial de cravo e de outras plantas medicinais, entre elas o capim-limão, observaram o seu efeito inibitório sobre duas bactérias patogênicas, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, causadoras de contaminações em alimentos, podendo ser óleos empregados como formas de controle microbiológico em alimentos.

O eugenol é o principal componente do óleo de cravo. Assim, óleos ricos em eugenol mostraram-se eficientes no controle de diversos patógenos pós-colheita de frutas, dentre eles *B. cinerea*, isolado de uva (COMBRINCK et al., 2011).

Contudo, um dos óleos mais conhecidos e utilizados é o óleo de eucalipto. Esse apresenta em sua composição principalmente o cineol. Lee et al. (2008) testando diversas espécies de *Myrtaceae*, entre elas *Corymbia citriodora*, demonstraram o efeito fungitóxico do óleo essencial de algumas dessas espécies sobre o oomycete *Phytophthora cactorum* e os fungos *Cryphonectria parasitica* e *Fusarium circinatum*. Pinto et al. (2008) demonstraram o efeito *in vitro* de extratos de folhas de eucalipto na inibição da germinação de *Sclerotium cepivorum*.

Assim como a citronela, na família *Poaceae*, o capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) apresenta-se com bons efeitos antifúngicos. Essa espécie é uma gramínea perene, de origem asiática (Índia), conhecida

popularmente como capim-cidrô, capim-limão, capim-cidreira, capim-cidrão, citronela de Java (CASTRO; CHEMALE, 1995). Apresenta odor aromático agradável característico de limão, sabor aromático e ardente e coloração verde-pálida (GOMES; NEGRELLE, 2003). Nguefack et al. (2004) avaliando o efeito do óleo essencial de *C. citratus* no crescimento micelial de fungos *in vitro*, observaram a redução de 64% do crescimento de *Fusarium moniliforme* na concentração de 200 ppm, *Aspergillus flavus* em 48% e *Aspergillus fumigatus* em 77% na concentração de 500 ppm, além de inibição total em 300 ppm para *F. moniliforme* e 1200 ppm para *A. flavus* e *A. fumigatus*.

O óleo essencial de capim-limão (em concentrações de 25 a 500 ppm) demonstrou efeito contra alguns dos patógenos pós-colheita *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*. Em concentrações a partir de 25 ppm houve inibição superior a 70% da produção de esporos, sendo que a 500 ppm a esporulação foi totalmente paralisada. A germinação de esporos e o comprimento do tubo germinativo dos patógenos foi concentração dependente para os patógenos *C. coccodes*, *B. cinerea*, *C. herbarum* e *R. stolonifer*. O mesmo óleo em concentrações superiores a 100 ppm estimularam a germinação de *A. niger* (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007).

Outro composto natural com efeitos antifúngicos é o extrato de própolis. Quando aplicado na concentração de 10%, em testes *in vitro*, mostrou potencial controle contra bactérias fitopatogênicas *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (BIANCHINI; BEDENDO, 1998). O uso de extrato etanólico de própolis mostrou efeito protetor contra ferrugem do cafeeiro em lavouras em produção e promoveu redução da incidência de cercosporiose em determinados meses (PEREIRA et al., 2008b).

Em relação a componentes voláteis de óleos essenciais, o uso de voláteis de nove plantas, sendo eles os aldeídos (hexanal, trans -2-hexenal, citral, trans-cinnamaldeído, p-anisaldeído), os fenóis (carvacrol e eugenol) e as cetonas (2-nonanone(-)-carvone), mostraram-se eficientes no controle de *Penicillium expansum*, agente causal da podridão azul da pereira. Nas condições *in vitro*, quanto à germinação de esporos e crescimento micelial, trans-2-hexenal, carvacrol, trans-cinnamaldeído e citral, demonstraram forte inibição. Em testes, *in vivo* por fumigação, trans -2-hexenal demonstrou controle eficiente quando aplicado por um período de 24 horas, iniciando 12 horas após a inoculação (NERI et al., 2006).

A identificação dos componentes torna-se importante por demonstrar quais compostos são os reais responsáveis pelos efeitos antifúngicos. Como no trabalho realizado com o uso do óleo essencial de folhas de *Calocedrus macrolepis* var. *formosana*. Esse óleo demonstrou efeito, segundo seus diferentes componentes, contra patógenos de solo. Foram identificados no óleo alfa-pineno (44,2%), limoneno (21,6%), beta-mirceno (8,9%), beta-cariofileno (8,2%), óxido cariofileno (2,4%), alfa cadinol (1,6%), beta-pineno (1,2%) e T-muurolol (1,1%). Desses componentes os sesquiterpenoides apresentaram efeito mais efetivo que monoterpenoides, desses T-muurolol e alfa-cadinol inibiram fortemente o crescimento de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*, além disso, foram eficientes no controle do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis funerea*, *Ganoderma australe* e *Fusarium solani*. O óleo dessa planta demonstrou eficiente controle para uma gama de patógenos de solo, mostrando como potencial produto alternativo para essa finalidade (CHANG et al., 2008).

Assim, com esses exemplos nota-se o avanço das pesquisas com óleos essenciais demonstrando o potencial para o controle de fitopatógenos.

2.5 Doenças em morangueiro

Como em grande parte dos cultivos intensivos, para o morangueiro, o clima favorável ao patógeno, o cultivo intensivo, a má qualidade das mudas destinadas ao plantio, a ausência de cultivares resistentes aceitas comercialmente e práticas culturais inadequadas tornam as doenças um dos principais fatores limitantes para a produção de morango no país.

A produtividade e a qualidade dos frutos do morangueiro são influenciados por fotoperíodo, temperatura, pragas, doenças, condições do solo, adubação, variações na humidade do ar e de solo, entre outros (SILVA et al., 2007).

Na literatura, são citadas 51 espécies de fungos, três de bactérias, oito de nematoides e 26 de vírus afetando a cultura (MAAS, 1998). Dentre as principais doenças fúngicas são citadas: antracnose – coração vermelho – podridão chocolate, causada por duas espécies, *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum acutatum*, responsáveis pela podridão de rizoma e flor-preta; mancha de micosferela (*Mycosphaerella fragariae*); mancha de dendrofoma (*Phomopsis obscurans*); mancha de diplocarpon (*Diplocarpon earlianum*), podridão de fitóftora (*Phytophthora cactorum*); murcha de verticílio (*Verticillium dahliae*); oídio (*Sphaerotheca macularis* f.sp. *fragariae*); mofo cinzento (*Botrytis cinerea*). Entre as doenças bacterianas, a mais importante é a mancha angular causada por *Xanthomonas fragariae*. As doenças viróticas, veiculadas por afídeos ou por propagação vegetativa, são o vírus do mosqueado do morangueiro; vírus da clorose marginal do morangueiro; vírus da faixa-das-nervuras do morangueiro; vírus do encrespamento. Os principais nematoides são o enfezamento do morangueiro (*Aphelenchoides besseyi*); nematoide causador de galha (*Meloidogyne* spp.); nematoide das lesões (*Pratylenchus* spp.) (TANAKA et al., 2005; SIMON et al., 2005).

Dentre essas, citam-se no período pós-colheita, depreciando de maneira significativa o produto comercializado, o mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.), podridão de “rizopus” (*Rhizopus stolonifer* Ehrenb.: Fr.) e podridão de “penicillium” (*Penicillium digitatum*) (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003). Esse período pós-colheita é o período entre a colheita e o consumo, no qual perdas substanciais podem ocorrer devido às podridões de origem patológicas (DHINGRA, 1985).

O período entre a colheita e a armazenagem pode durar de um a vários dias, necessitando de uma ação rápida, seja de algum tratamento com fungicidas ou outros produtos, ou mesmo da atuação de agentes de controle biológico. O controle de doenças em pós-colheita é complicado, mas vem avançando em diversos aspectos, dentre eles com a aplicação de produtos, como fungicidas e/ou com tecnologias avançadas de armazenagem (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). Para o morango, a pós-colheita é um dos maiores desafios, criar alternativas que elevem a vida de prateleira, que é muito curta, devido às características intrínsecas ao próprio fruto.

O controle após a colheita tem como objetivos evitar que os patógenos latentes nos tecidos causem podridões e impedir novas infecções (BETTIOL; GHINI, 1995).

Para que medidas de controle fitossanitário possam ser tomadas adequadamente e com eficiência, é preciso conhecer bem o ciclo das relações patógeno-hospedeiro da doença em questão, isto é, como e onde o patógeno sobrevive, como ele é disseminado, quais são as suas vias de infecção, que condições ambientais favorecem a sua colonização e multiplicação (UENO, 2004).

2.5.1 Mofo cinzento do morangueiro

A doença é causada pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers. & F., anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (MAAS,1998). A enfermidade causada é conhecida por "mofo cinzento" devido ao bolor de cor cinza característico formado sobre as lesões causadas nos frutos.

A podridão promovida por *B. cinerea* é a principal doença em pós-colheita da cultura do morangueiro (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008). O fungo é de ocorrência mundial, necrotrófico, possui registro de ataque em mais de 200 espécies de plantas, atacando todos os órgãos da planta na maioria dos estágios de desenvolvimento da planta, possui vários mecanismos patogênicos e alta variabilidade genética, podendo adquirir resistência facilmente a princípios ativos de fungicidas (HELBIG, 2001; WILLIAMSON et al., 2007; ROSSLENBROICH; STUEBLER, 2000; SUTTON; PENG, 1993).

É considerado um parasita facultativo, com atividade saprofítica na matéria orgânica ou em restos culturais, formando esclerócio e micélio dormente na ausência do hospedeiro. O fungo pode sobreviver ao inverno em restos de culturas, coloniza as folhas e cálices como agente endofítico e, nesses tecidos, inicia a infecção da flor e dos frutos e a produção dos conídios (MAAS, 1998).

Condições que favorecem o mofo cinzento são: o excesso de fertilização nitrogenada, irrigação por aspersão, alta umidade, espaçamentos adensados, manutenção de folhas e frutos doentes, chuvas frequentes, danos na colheita, temperaturas entre 18 a 23 °C (MAAS, 1998; HELBIG, 2001; COSTA et al., 2003). O fungo coloniza as folhas e cálices como agente endofítico e, nesses tecidos, inicia a infecção da flor e dos frutos e a produção dos conídios (SIMON et al., 2005).

O fungo produz esclerócios irregulares e negros que são infrequentes em plantas de morangueiro, mas podem aparecer em pecíolos mortos e resíduos de cultivos subsequentes, plantas daninhas mortas ou mesmo em palhada (BRAUN; SUTTON, 1987).

Conídios do fungo infectam folhas, frutos maduros e flores em qualquer tempo durante o período vegetativo, mas os sintomas não aparecem até que as folhas infectadas senesçam e caiam. O fungo torna-se então ativo, coloniza tecidos mortos e esporula produzindo o inóculo subsequente (BRAUN; SUTTON, 1988). Nos frutos pode permanecer latente, no interior do receptáculo floral, até a maturação do fruto devido ao baixo conteúdo de açúcares e alto conteúdo de ácido nos frutos jovens (HELBIG, 2001). Os sintomas surgem como manchas marrom-claras, de tamanho variável, não aquosa, sem linha demarcando o tecido afetado. As manchas evoluem rapidamente tomando todo o fruto, que apodrece, adquirindo um aspecto seco e firme, com um recobrimento de cinza, constituído pelas estruturas do fungo (TANAKA et al., 2002, 2005).

A infecção acontece por ferimentos e durante a colonização do tecido do hospedeiro, as células infectadas são desintegradas por ação de enzimas do patógeno, dando origem às podridões e manchas. No fruto o fungo cresce através das rachaduras na casca e produz grande quantidade de esporos (HELBIG, 2001). Na presença de umidade, a germinação dos conídios e a infecção podem ocorrer em poucas horas (PLAKIDAS, 1964).

B. cinerea possuem uma grande capacidade de matar células do hospedeiro. Essa morte de células deve-se a produção de metabólitos secundários e proteínas que apresentam atividade fitotóxica (VAN KAN, 2006).

Os frutos podem ser infectados desde o início de sua formação, pela infecção das flores, e neles o fungo permanecer dormente até o amadurecimento. Em frutos verdes, os sintomas são caracterizados pela presença de pequenas lesões castanhas levemente depressivas. Em frutos maduros, essas lesões

tornam-se recobertas por um crescimento acinzentado constituído por estruturas do patógeno, que rapidamente tomam toda superfície do fruto. Com a evolução dos sintomas, os frutos podem apodrecer completamente ou ainda assumir a forma de mumificados (HELBIG, 2001).

Quando o ocorre a esporulação nos frutos ainda no campo, esses frutos representam importantes fontes de inóculo primário, em sistemas anuais, nos quais ocorrem múltiplas florações e colheitas durante vários meses (MAAS, 1998).

Medidas de controle baseiam-se no uso de cultivares resistentes ao patógeno, com morangos firmes e resistentes ao manuseio de colheita e a limpeza e destruição semanal de folhas, flores e frutos com sintomas (SIMON et al., 2005). Além disso, podem ser realizadas aplicações de fungicidas e controle biológico (DIAS et al., 2007).

Botrytis cinerea apresenta alto risco quanto à resistência a fungicidas (MYRESIOTIS et al., 2007), além disso, a intensa aplicação de fungicidas ocasiona problemas quanto à resíduos de produtos nos frutos comercializados (LEGARD et al., 2005). Na maior região produtora de morango do Brasil, o Estado de Minas Gerais, o mofo cinzento é a principal doença, responsável pelas aplicações de fungicidas (COTA et al., 2009).

2.5.2 Antracnose do morangueiro

O termo antracnose no morangueiro designa o complexo de doenças causadas por espécies de *Colletotrichum*. Dentre essas espécies citam-se *C. fragariae* Brooks, *C. acutatum* Simmonds, *C. gloeosporioides* (*Glomerella cingulata* (Ston.) Spauld. & Schrenk) e *C. dematium* (Pers.) Grove. As diversas espécies patogênicas acometem todas as partes da planta, desde o rizoma até os frutos (HOWARD et al., 1992).

Conhecida como podridão chocolate, coração vermelho, causada por *C. fragariae* Brooks, ataca rizoma, estolho, rizoma e frutos; e flor preta causada por *C. acutatum* Simmonds, ataca flores, frutos, mas dificilmente rizomas (DIAS et al., 2007).

Esse fungo produz acérvulos, nos quais crescem os conidióforos e conídios unicelulares, hialinos e com formato elipsoide-fusifforme. Em meio de cultura, o fungo tem coloração rosa-alaranjada, porém não apresenta a fase teleomórfica. Em condições de alta umidade, há formação de massa de esporos de coloração rosada sobre as lesões (GUNNELL; GUBLER, 1992).

Juntamente com o mofo cinzento, é uma importante doença das regiões produtoras do Brasil, podendo causar prejuízos superiores a 50% em alguns casos. Nos Estados Unidos, nos anos de 1970 a 1990 essa doença apresentava como um dos principais problemas para a cultura (HOWARD et al., 1992). Promovendo danos consideráveis, acometendo flores, frutos e até mesmo as plantas por completo, quando em condições favoráveis (DIAS et al., 2007).

A doença se caracteriza por apresentar manchas necróticas, deprimidas, de cor escura, nos estolões, pecíolos, folhas e frutos. Nas plantas infectadas ocorre apodrecimento seguido de coloração marrom no rizoma, por isso é chamada "podridão chocolate". Os frutos colonizados pelo patógeno desenvolvem uma podridão seca e escurecem, mumificando os frutos imaturos e apodrecendo totalmente os frutos maduros, às vezes pela invasão dos tecidos por outros agentes patogênicos (SIMON et al., 2005). *C. acutatum* é a espécie predominante em infecções de flores e frutos (WILSON et al., 1993).

O principal sintoma observado nas plantas em condições de campo é a necrose progressiva dos pedúnculos e demais partes dos órgãos florais, culminando com a secagem e morte das flores (flor preta). Os frutos pequenos e em crescimento também são atacados, adquirindo coloração escura e tornando-se mumificados (UENO, 1996).

Além das lesões em flores e frutos, podem ocorrer lesões necróticas deprimidas, de cor castanha escura, sobre pecíolos e estolhos, e podridão de meristemas que normalmente causam a morte das plantas em poucos dias ou algumas semanas após o transplante das mudas no campo. *C. acutatum* também pode causar manchas irregulares nas folhas, sendo comum em folhas novas, iniciando a necrose pelas margens (HOWARD et al., 1992). Em frutos infectados e mumificados, o patógeno pode permanecer por cerca de dois anos (WILSON et al., 1993).

A ocorrência é favorecida por temperaturas entre 25 e 30 °C e alta umidade, períodos chuvosos de 2 dias ou mais são extremamente favoráveis ao rápido desenvolvimento da doença, principalmente em variedades suscetíveis (TANAKA et al., 1994; HOWARD et al., 1992). Em frutos imaturos, temperatura em torno de 25 °C são condições ótimas para causar infecção em mais de 80% dos frutos (WILSON et al., 1993).

Formas de manejo da doença são a aplicação de fungicidas registrados para a cultura, mudas certificadas, eliminação de restos culturais, eliminação de flores e folhas contaminadas, e adubação nitrogenada equilibrada (DIAS et al., 2007). Variedades resistentes são difíceis devido ao número de patógenos diferentes, além de sua variabilidade patogênica (HOWARD et al., 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Epidemiologia e Controle de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia (DFP), na Central de Análise e Prospecção Química do Departamento de Química (DQI) e no setor de Olericultura, do Departamento de Agricultura, todos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras – MG.

3.1 Obtenção dos óleos essenciais e identificação de componentes químicos

Os óleos essenciais selecionados para o presente estudo constaram daqueles que já apresentavam algum relato em literatura com efeito fungicida ou fungistático sendo realizada assim uma triagem inicial. Levou-se em conta ainda a facilidade para aquisição, ou seja, a disponibilidade do produto para a venda.

Os óleos essenciais empregados nos experimentos foram segundo a família botânica ao qual pertencem:

- Lamiaceae - alecrim (*Rosmarinus officinalis*), menta (*Mentha pipertita*), lavandim (*Lavandula hybrida*);
- Lauraceae – tea tree (*Melaleuca alternifolia*);
- Myrtaceae - canela (*Cinnamomum zeilanicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Corymbia citriodora*);
- Poaceae - citronela (*Cymbopogon nardus*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e palmarosa (*Cymbopogon martini*) e;
- Rutaceae - laranja doce (*Citrus sinensis* var. *dulcis*), tangerina (*Citrus nobilis* var. *tangerinae*).

Todos os óleos foram adquiridos da empresa Florananda Indústria e Comércio de Cosméticos e Produtos Naturais, localizada na cidade de Jaú, Estado de São Paulo.

A análise fitoquímica dos óleos para identificação dos componentes foi feita em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu). O cromatógrafo gasoso utilizou o hélio ultrapuro como gás de arraste com fluxo de 1,8 mL.min⁻¹, temperatura do injetor em 220 °C, modo de injeção *Split* de 1:15, injeção manual, tempo de corrida estabelecido em 70 minutos, em coluna Equily-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com forno da coluna a 60 °C por 2 minutos, aquecimento a 3 °C.min⁻¹ até 240°C, permanecendo em 240 °C por 15 minutos. O espectrômetro de massas utilizou a interface GC-MS,

a 250 °C, com fonte de íons a 200 °C e modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os componentes dos óleos essenciais foram identificados mediante comparação dos índices de similaridade de espectro de massa (áreas relativas em porcentagem) apresentados com os dados disponíveis na biblioteca do próprio cromatógrafo (FFNSC 1.2).

3.2 Obtenção dos isolados de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Colletotrichum acutatum*

Os isolados patogênicos de *B. cinerea*, *C. gloesporioides* e *C. acutatum* foram obtidos a partir de isolamento direto de estruturas fúngicas de frutos de morangueiro infectados, coletados em área experimental do Setor de Olericultura – Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras – Lavras – MG, em área de cultivo comercial em Tocos do Moji – MG e em frutos comerciais adquiridos no comércio de Lavras – MG.

Para o isolamento, estruturas fúngicas e/ou conídios presentes nos frutos coletados foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose e Ágar) com o auxílio de microscópio estereoscópio. Seis isolados de *B. cinerea*, e um isolado de cada *Colletotrichum* purificados foram mantidos em câmaras de crescimento do tipo B.O.D. (, a 23 °C e sob fotoperíodo de 12 horas. A identificação foi feita por comparação com literatura especializada.

Para avaliar a patogenicidade, frutos de morangueiro previamente higienizados em água corrente e desinfestados com hipoclorito de sódio a 2% (NaClO 2%) e água destilada foram inoculados, utilizando suspensão de esporos, com os isolados obtidos e mantidos em temperatura ambiente em recipientes plásticos, semelhantes aos utilizados para comercialização. Posteriormente foi observada a presença e severidade de sintomas das doenças

causadas pelos patógenos. Assim, foram selecionados quatro isolados para a realização dos experimentos conforme Tabela 1.

Tabela 1 Relação de isolados utilizados nos experimentos

Patógeno	Identificação	Origem
<i>Botrytis cinerea</i>	CML 2065	Lavras - MG
<i>Botrytis cinerea</i>	CML 2066	Tocos do Moji - MG
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	UFLA 1	Lavras - MG
<i>Colletotrichum acutatum</i>	UFLA 2	Tocos do Moji - MG

3.2.1 Sensibilidade de isolados de *Botrytis cinerea* a fungicidas

Os dois isolados de *B. cinerea* (CM 2065 e CM 2066) foram testados em relação à sensibilidade ao fungicida a base de tiofanato metílico (fungicida sistêmico do grupo dos benzimidazóis) registrado para a cultura do morangueiro nas doses de 250, 500, 1000, 2000, 4000 ppm do fungicida, devido a suspeitas de existência de isolados resistentes ao princípio ativo.

Os dois isolados selecionados foram avaliados também em relação ao crescimento em presença de outros fungicidas com diferentes princípios ativos. Foram escolhidos:

- Hidróxido de cobre - fungicida de contato, inorgânico, dose recomendada do fungicida: 125 g/100 L.
- Procimidona - fungicida sistêmico do grupo das carboxamidas, dose recomendada do fungicida: 50 g/100 L.
- Fluazinan - fungicida/ acaricida de contato do grupo das fenilpiridinilaminas, dose recomendada do fungicida: 100 mL /100 L.
- Azoxistrobina e ciproconazol - fungicida sistêmico do grupo das estrobilurinas e triazóis, dose recomendada do fungicida: 400 mL /100 L.

Todos os fungicidas foram incorporados ao meio de cultura BDA fundente (50 °C) nas doses recomendadas pelo fabricante e no dobro da dose recomendada. Como tratamento testemunha, foi usada uma placa de Petri contendo apenas o meio de cultura BDA.

Para avaliar o crescimento micelial, no centro de cada placa foi colocado um disco de 9 mm de diâmetro do micélio da cultura pura dos isolados de *B. cinerea*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, sendo uma placa de Petri uma unidade experimental. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD a 23°C, com fotoperíodo de 12 horas. Foi realizada a medição do diâmetro das colônias, em posição ortogonal a cada 24 horas até que um tratamento atingisse o diâmetro total da placa de Petri.

Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do “Índice de Velocidade de Crescimento Micelial”, empregando a equação:

$IVCM = \frac{\sum(D-d_a)}{N}$, na qual: IVCM= Índice de Velocidade de Crescimento Micelial, D= diâmetro médio atual da colônia, D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior, N= número de dias após a inoculação.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e posteriormente ao teste de Skott Knott ($p \leq 0,05$) para o agrupamento das médias, através do *software* R (R Development Core Team, 2012). Os gráficos foram plotados com o *software* Sigma Plot 12.0.

3.3 Experimentos in vitro

Nas etapas in vitro foram realizados experimentos referentes a bioatividade dos óleos essenciais em relação aos patógenos, a sensibilidade de *Botrytis cinerea* aos fungicidas e o antagonismo de *Trichoderma* a patógenos de morangueiro.

3.3.1 Bioatividade de óleos essenciais no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Colletotrichum acutatum*

Para os testes de crescimento micelial dos patógenos, foram empregados os óleos essenciais de capim-limão, palmarosa, citronela, cravo, canela, menta, lavanda, tangerina, eucalipto, melaleuca, alecrim e laranja; nas concentrações de 125 e 1000 ppm e os isolados de *B. cinerea* (CM2065), *C. gloesporioides* (UFLA1) e *C. acutatum* (UFLA2).

Essas concentrações foram escolhidas baseadas em experimentos preliminares com os óleos essenciais, nos quais foram testados dois óleos, menta e capim-limão, nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 ppm para os três patógenos. A concentração de 125 ppm apresentou os primeiros resultados para o óleo de capim-limão em relação à redução do crescimento micelial dos patógenos e a concentração de 1000 ppm inibiu completamente os patógenos, por isso, essas concentrações foram escolhidas para os testes posteriores com todos os óleos essenciais (Figura 1).

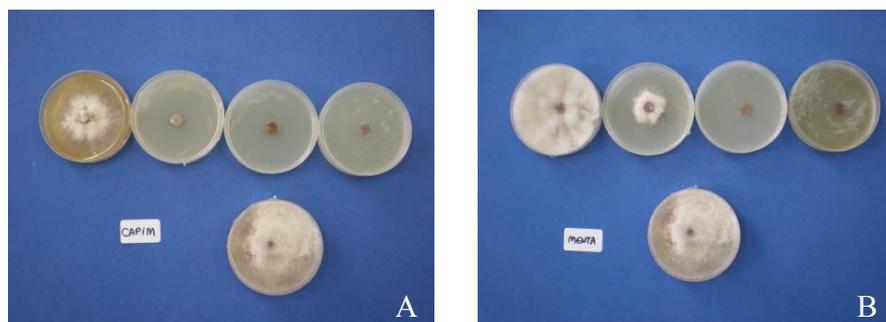


Figura 1 Testes preliminares para escolha das concentrações a serem utilizadas nos experimentos *in vitro* para *Botrytis cinerea*. A – óleo essencial de capim-limão, B – óleo essencial de menta. Acima, concentrações de 125, 250, 500 e 1000 ppm e abaixo, testemunha.

Os óleos essenciais foram incorporados ao meio de cultura BDA fundente (50 °C) juntamente com o agente surfactante Tween 20 (0,05 mL).

Como tratamento testemunha, foi usada uma placa de Petri contendo apenas o meio de cultura BDA. Como comparação, adotou-se um padrão químico considerado eficiente no combate dos patógenos de morangueiro, representado por um fungicida a base de tiofanato metílico, incluído ao meio de cultura na dose 1000 ppm. Contudo, por apresentar inibição completa do crescimento dos patógenos o fungicida não foi considerado para as análises estatísticas.

Para a avaliação do crescimento micelial, foi colocado no centro de cada placa, um disco de 9 mm de diâmetro do micélio da cultura pura do patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (duas concentrações – 125 e 1000ppm) x 12 (tratamentos com óleos essenciais) + 1 (testemunha). Foram feitas três repetições por tratamento, sendo uma placa de Petri uma unidade experimental.

As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD a 23 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Foi realizada a medição do diâmetro das colônias, em posição ortogonal a cada 24 horas até que um tratamento atingisse o diâmetro total da placa de Petri.

Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do “Índice de Velocidade de Crescimento Micelial”. Para análise estatística, os valores obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância e quando significativos foram submetidos ao teste Skott Knot ($p \leq 0,05$) com o auxílio dos programas computacionais SAS (SAS INSTITUTE, 1998) e R (R Development Core Team, 2012). Os gráficos foram plotados com o *software* Sigma Plot 12.0.

3.3.2 Produção de conídios e germinação de conídios de *Botrytis cinerea*

A produção e a germinação de esporos foi realizada para, empregando o isolado CM 2065 de *B. cinerea*.

A produção de conídios foi avaliada após o total crescimento do patógeno nas placas de Petri. Para cada placa foram adicionados 20 mL da solução água destilada e Tween 20 (0,01%) autoclavados. A superfície da colônia foi raspada com auxílio de Alça de Drigalsky. Os esporos de cada placa foram filtrados em gaze e acondicionados em béquer.

Para cada suspensão de esporos, quatro alíquotas de 0,1 mL foram transferidas, separadamente, para uma lâmina de hemacitômetro, na qual foi realizada a contagem de esporos com o emprego de microscópio óptico. Os dados médios de quatro contagens foram considerados segundo a quantidade de conídios produzidos na área total de cada placa de Petri. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, e a unidade experimental composta por uma contagem efetuada no hemacitômetro.

A germinação de esporos foi avaliada realizando a contagem de esporos germinados do patógeno. Para isso, os mesmos óleos essenciais na concentração 1000 ppm foram misturados ao agente dispersante Tween 20 (0,05 mL) e incorporados ao meio de cultura ágar-água em placas de Petri.

Paralelamente, uma suspensão de esporos (10^5) do patógeno foi elaborada e disposta em gotas sobre o meio de cultura. Esses esporos foram obtidos pela raspagem de uma placa de Petri que continha uma colônia crescida do patógeno por sete dias, sendo os esporos transferidos para um béquer contendo água destilada estéril.

Para a inoculação, foram utilizados 20 μ L da suspensão de conídios, dispostas sobre o meio de cultura. Após a inoculação, as placas permaneceram em temperatura de 23°C por 24 horas. O crescimento dos conídios foi paralisado com a aplicação de solução de azul de lactofenol.

Realizou-se a avaliação, com a contagem de 50 conídios, por repetição, com auxílio de microscópio óptico. A partir dos dados de conídios germinados foi obtida a porcentagem de germinação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, representadas por quatro contagens, totalizando duzentos conídios por tratamento.

Para análise estatística, os valores obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância, transformados quando necessário, e quando significativos foram submetidos ao teste de Tukey com o auxílio do programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

3.3.3 Bioatividade de componentes voláteis de óleos essenciais no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

Os mesmos óleos essenciais testados anteriormente (capim-limão, palmarosa, citronela, cravo, canela, menta, lavanda, tangerina, eucalipto, melaleuca, alecrim e laranja) foram pipetados sobre papéis de filtro esterilizados (0,5 cm de diâmetro) colocados em três pontos equidistantes sobre o meio de cultura BDA vertido previamente em placas de Petri. Em cada ponto colocou-se uma alíquota de 5 μL , totalizando 15 μL por placa de Petri, sem que houvesse escorrimento sobre o meio BDA.

Essa metodologia foi adotada por não haver concordância em literatura entre as metodologias utilizadas para esse tipo de análise. O presente método permite a realização do experimento em condições livres de contaminação, visto que todo o material empregado pode ser esterilizado.

Após a colocação dos óleos essenciais, no centro de cada placa foi colocado um disco de 9 mm de diâmetro do micélio da cultura pura do patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições

por tratamento, sendo uma placa de Petri uma unidade experimental. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD a 23 °C.

Foi realizada a medição do diâmetro das colônias, em posição ortogonal a cada 24 horas até que um tratamento atingisse o diâmetro total da placa de Petri. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do “Índice de Velocidade de Crescimento Micelial”.

Para análise estatística, os valores obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância quando significativos foram submetidos ao teste de Skott Knot ($p \leq 0,05$) com o auxílio do programa computacional R (R Development Core Team, 2012). Os gráficos foram plotados com o *software* Sigma Plot 12.0.

3.3.4 Manejo de resistência de *Botrytis cinerea* com óleos essenciais

A partir dos resultados anteriores, foram escolhidos dois óleos essenciais, capim-limão e canela, com boa eficiência na redução do crescimento micelial do patógeno *B. cinerea* para avaliar no isolado resistente ao princípio ativo tiofanato metílico (CM 2066).

O experimento seguiu a mesma metodologia empregada no ensaio de crescimento micelial, no qual os óleos foram incorporados ao meio de cultura. Contudo, foram testadas as concentrações de 125, 250, 500 e 1000 ppm para os dois óleos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, sendo uma placa de Petri uma unidade experimental.

As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD a 23 °C, fotoperíodo de 12 horas. Foi realizada a medição do diâmetro das colônias, em posição ortogonal a cada 24 horas até que um tratamento atingisse o diâmetro total da placa de Petri. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do “Índice de Velocidade de Crescimento Micelial”.

Para análise estatística, os valores obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância e quando significativos foram submetidos à análise de regressão com o auxílio dos programas computacionais SAS (SAS INSTITUTE, 1998). Os gráficos foram plotados com o *software* Sigma Plot 12.0.

3.3.5 Antagonismo de *Trichoderma* spp. à *Botrytis cinerea* e *Colleotrichum acutatum*

Para obtenção dos isolados de *Trichoderma* coletaram-se amostras de solo de diferentes áreas (lavoura experimental convencional, lavoura experimental orgânica, lavoura comercial convencional de morangueiro e área de floresta nativa). Das amostras foram pesados 10 g de solo e adicionados 40 mL de água destilada, após agitação, foi realizada uma diluição seriada em tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada. De todos os tubos de ensaio da série foram pipetados 1 mL e plaqueados em placa de Petri contendo meio BDA. Após 48 horas foram feitas culturas puras das colônias de *Trichoderma*. Da prospecção realizada foram selecionados quatro isolados. Foram utilizados mais dois isolados, um de *Trichoderma virens* e outro de *Trichoderma harzianum* (Tabela 2). E os isolados de *B. cinerea* (CM2066) e *C. acutatum* (UFLA2).

Tabela 2 Isolados de *Trichoderma* empregados nos experimentos de antagonismo.

Identificação	Local de obtenção do isolado
T1	isolado obtido de área orgânica
T2	isolado obtido de área convencional
T3	<i>Trichoderma virens</i>
T4	<i>Trichoderma harzianum</i>
T5	isolado obtido de lavoura comercial convencional
T6	isolado obtido de área de floresta nativa

Para o teste de antagonismo em confrontação direta foi colocado em um dos lados de uma placa de Petri, contendo BDA, um disco com 9 mm de

diâmetro de micélio dos fungos patogênicos (*B. cinerea* e *C. acutatum*) e no outro lado um disco de *Trichoderma*, de forma opostas e equidistantes um disco do outro. As placas foram incubadas a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após esse período foi observada a presença de halo de inibição e avaliado o diâmetro médio das colônias do fitopatógenos e antagonistas, com auxílio de régua milimetrada.

Para o teste de metabólitos não voláteis, utilizou-se uma folha de papel celofane cobrindo a superfície do meio BDA em uma placa de Petri. Sobre o papel celofane foi colocado um disco de micélio dos isolados de *Trichoderma* spp. centralmente, sendo as placas incubadas a 25 °C por 48 horas, com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período retirou-se o papel celofane, juntamente com a colônia de *Trichoderma* formada. As placas foram invertidas, adicionando-se 10 mL de clorofórmio na parte inferior (tampa), visando eliminar resíduos estruturais de *Trichoderma*. Após a evaporação do reagente, voltou-se a posição original das placas de Petri, e sobre essas foi colocado um disco de micélio dos patógenos. Os fungos foram incubados a 25 °C, sobre o fotoperíodo de 12 horas luz. Após sete dias mediu-se o diâmetro médio do crescimento dos patógenos.

Para o teste de metabólitos voláteis, placas de Petri de igual tamanho, contendo meio BDA, foram posicionadas umas sobre as outras. Na extremidade inferior da placa, plaqueou-se um disco contendo micélio dos isolados de *Trichoderma* e na superior plaqueou-se discos de um dos patógenos. As placas foram vedadas lateralmente com filme plástico, incubando-se a 25 °C, durante sete dias, sob fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro das colônias em confrontação, comparando-se com a testemunha constituída apenas de placas com os patógenos.

Para o teste de metabólitos termoestáveis foram colocados em *erlernmeyers* discos de 9 mm dos isolados de *Trichoderma* com 150 mL de meio

líquido, mantendo por sete dias de crescimento em mesa agitadora a 120 rpm. Após esse período, o conteúdo foi filtrado e autoclavado, vertendo 25% em meio BDA fundente (50 °C).

Após a solidificação dos meios de cultura foram plaqueados discos de micélio dos patógenos com 9 mm de diâmetro no centro das placas de Petri, que foram incubadas a 25 °C, sob o fotoperíodo de 12 horas. A testemunha foi constituída apenas com placas contendo os fitopatógenos e meio BDA, após sete dias mediu-se o diâmetro médio do crescimento micelial dos patógenos.

Para a interação de hifas utilizou-se metodologia semelhante ao cultivo pareado inserindo uma lamínula de vidro de 24 x 40 mm previamente esterilizada posicionada centralmente entre as colônias do antagonista *Trichoderma* spp. e os patógenos. Os fungos foram incubados a 25 °C durante sete dias sob o fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e montadas em lâminas microscópicas para observação no microscópio óptico.

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para análise estatística, os valores obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância, quando significativos foram submetidos aos testes de Skott Knot ($p \leq 0,05$) com o auxílio do programa computacional R (R Development Core Team, 2012). Os gráficos foram plotados com o *software* Sigma Plot 12.0.

3.4 Testes *in vivo* para o controle de *Botrytis cinerea* do morangueiro

Com intuito de confirmar os resultados obtidos *in vitro*, bem como testar em condições simulando as reais, com a interação entre o patógeno e o hospedeiro, os mesmos óleos testados no primeiro experimento foram testados

em discos de folhas de morangueiro conforme a metodologia adaptada de MACHADO; BETTIOL (2010).

Foram empregados períodos diferentes de dispensação dos óleos essenciais: antes do patógeno, simultaneamente e posteriormente a inoculação do patógeno. Foi adotada a concentração de 1000 ppm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 (períodos de dispensação dos óleos essenciais) x 13 óleos essenciais + 2 (testemunha e fungicida). Foram feitas três repetições por tratamento, com 10 discos de folha por repetição, contidos em uma placa de Petri.

Discos das folhas foram retirados de plantas de morangueiro saudáveis cultivadas em condições normais mantidas em casa de vegetação. Os discos de folha obtidos com o auxílio de um perfurador (1,2 mm de diâmetro) foram desinfestados superficialmente com uma solução de hipoclorito de sódio 2% (por 1 min), etanol 70% (por 1 min) e água destilada esterilizada (por 1 min. duas vezes).

Após a desinfestação, os discos foram separados por tratamento, num total de 10 discos cada, sendo transferidos para placas de Petri contendo uma folha de papel de filtro esterilizado umedecido com água destilada esterilizada. Os tratamentos com os óleos essenciais e o fungicida foram aplicados pulverizando os discos de folha até o completo molhamento. Para a pulverização foi empregado o adjuvante alquil-fenol-poliglicoléter na dose de 10 mL.100 L⁻¹. Após a aplicação dos tratamentos as placas de Petri fechadas foram mantidas em condição ambiente.

No terceiro dia após a inoculação do patógeno, segundo as diferentes épocas de dispensação do óleo essencial, os discos foram transferidos para placas de Petri com meio PCA (*paraquat cloranfenicol ágar*).

A avaliação das folhas foi realizada cinco dias após a colocação no meio PCA, os valores de incidência foram transformados em porcentagem em relação ao número de bolinhas cobertas pelo patógeno para cada repetição.

Os dados obtidos nos tratamentos, separadamente para cada um dos tempos de dispensação do óleo essencial, foram submetidos à análise de variância e submetidos ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) com o auxílio do programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1998), o gráfico foi plotado no *software* Sigma Plot 12.0.

3.5 Óleos essenciais no controle de patógenos do morangueiro em campo

O experimento foi realizado na área experimental do setor de Olericultura do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, localizado nas coordenadas geográficas 21°14'30"S e 45°00'10"W, e 918 m de altitude, em um Latossolo Vermelho Distroférico. Os dados climatológicos referentes à pluviosidade foram obtidos da estação meteorológica no Setor de Agrometeorologia do Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras.

As mudas das cultivares de morangueiro Oso Grande e Aromas foram obtidas de produtores de mudas do município de Bom Repouso-MG. A área experimental passou por gradagem, seguida de encanteiramento mecanizado, sendo os canteiros de 1,20 m de largura com aproximadamente 20 cm de altura. O espaçamento entre plantas empregado foi de 0,25 m x 0,25 m.

Anteriormente ao preparo foi realizada uma amostragem de solo para avaliar das características de fertilidade do solo, não sendo necessária a realização de calagem, devido às condições ótimas para o desenvolvimento da cultura (Saturação por Bases de 80%). A adubação consistiu de composto orgânico na dosagem de 3 Kg.m⁻², incorporados superficialmente nos canteiros.

Após o transplântio das mudas, os canteiros foram cobertos com filme de polietileno preto (*moulching*) de 150 mm de espessura para o controle de plantas espontâneas. A irrigação foi feita por aspersão seguindo as necessidades da cultura. Durante o desenvolvimento da cultura aplicações semanais por pulverização de biofertilizante foram realizadas, sempre após a realização das colheitas e antes a aplicação dos tratamentos. O controle de herbívoros foi realizado pelo cercamento da área com polietileno.

O biofertilizante foi elaborado com a seguinte formulação: 1 L de leite, 500 g de rapadura moída, 200 g de farinha de osso, 200 g de calcário, 200 g de fosfato de Araxá, 100 L de água não clorada e 20 Kg de esterco bovino fresco. Todos os componentes foram mantidos sob fermentação anaeróbica, em bombona plástica, por 15 dias.

O delineamento experimental foi de blocos inteiramente casualizado, constando de três repetições. A unidade experimental foram parcelas de 1,8 m de comprimento x 1,2 m de largura, sendo 20 plantas e área útil avaliada de 12 plantas (Figura 5).

Os tratamentos para o controle de doenças constaram dos óleos essenciais de capim-limão, canela, menta (dose 1000 ppm) e própolis (2000 ppm). O própolis foi usado por apresentar resultados interessantes no controle de patógenos em outros experimentos *in vitro*, podendo servir como comparação com os óleos essenciais nas condições de campo.

Os óleos foram escolhidos como sendo os agentes com efeitos positivos com menores custos de aquisição, disponibilidade no mercado regional, e produtos originários de espécies cujos metabólitos secundários foram diferentes segundo a análise química realizada. Como controle positivo, da mesma forma que nos testes anteriores foi feita uma testemunha (controle negativo), com aplicação apenas de água e um tratamento com o indutor de resistência acibenzolar – S - metil na dose recomendada pelo fabricante (0,1 g.L⁻¹).

Para a aplicação foi utilizado pulverizador costal a base de CO₂. Os tratamentos foram misturados ao adjuvante alquil-fenol-poliglicoléter na dose de 10 mL.100 L⁻¹, que possui a função de espalhante adesivo. As aplicações dos tratamentos foram realizadas semanalmente, no início da floração da cultura.

O desempenho agrônômico das cultivares, mediante os tratamentos aplicados, foi avaliado pela análise de variáveis relacionadas à produção, número de frutos/parcela; massa média de frutos/parcela; classificação dos frutos. Os valores médios obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância e submetidos ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) com o auxílio do programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

Para o monitoramento no campo de mofo cinzento e antracnose foram realizadas duas análises mensais, a partir do início de produção dos morangos, visualmente, avaliando-se a incidência dessas doenças nas parcelas. Para a avaliação de mofo cinzento, antracnose e podridões em geral, após a colheita e aferição da massa, foram selecionados aleatoriamente 12 frutos por repetição e acondicionados em embalagens plásticas próprias para a comercialização de morangos ou semelhantes às mesmas. Essas embalagens foram mantidas em ambiente controlado simulando condições de mercado com temperatura variando entre 15 a 20 °C.

3.6 Pós-colheita de frutos de morangueiro sob ação de óleos essenciais

Foram realizadas as seguintes análises em pós-colheita: pH, Sólidos Solúveis Totais, Acidez Total Titulável e obtido o valor para o ratio, representado pela relação Sólidos Solúveis Totais pela Acidez Total Titulável.

Depois de colhidos, os frutos de cada parcela foram armazenados em recipientes plásticos e em ambiente refrigerado, pelo fato de que se tornam facilmente deterioráveis após a colheita, até o momento das análises. Amostras

foram selecionadas de acordo com a uniformidade de cor, tamanho e ausência de injúrias mecânicas e fisiológicas. Não foi feito nenhum tipo de sanitização dos frutos para a realização do experimento.

Para as análises foi retirada uma amostra composta de três frutos de toda a colheita obtida de cada uma das três parcelas dos tratamentos. Dessas amostras retirou-se 10 g dos frutos de morango da porção mediana. Após a pesagem, acrescentou-se 50 mL de água destilada e as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um *mixer* comum. O extrato de cada amostra foi dividido em três partes para as devidas análises.

Para a medição do pH, utilizou-se diretamente o extrato aquoso, em potenciômetro digital de bancada, pH/mV/temperatura, faixa de 0 a 14, modelo PHS-3-B, marca PHTEK, conforme técnicas desenvolvidas pelo Instituto Adolfo Lutz (2005).

Para os Sólidos Solúveis Totais (SST), o mesmo extrato passou por leitura sólidos solúveis por refratometria, utilizando-se refratômetro analógico portátil Atago, Master T (faixa de medição de 0 a 33° Brix) com compensação automática de temperatura, sendo os resultados expressos em ° Brix.

A acidez titulável foi feita por titulação com NaOH a 0,1 N em uma amostra de 10 ml do suco da fruta, expressa em porcentagem de ácido cítrico (g de ácido cítrico. 100 g⁻¹ de tecido fresco), conforme técnicas padronizadas pelo Instituto Adolfo Lutz (2005).

A relação sólidos solúveis totais/acidez total titulável - ratio (SST/ATT) foi determinada pelo quociente entre as duas variáveis. Uma maior relação SST/ATT representa para os frutos um melhor equilíbrio entre o teor de sólidos solúveis e o ácido, conferindo sabor mais agradável, tornando-os mais atrativos.

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância, utilizando o pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1998), e a comparação das médias será feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.7 Óleos essenciais no controle de patógenos do morangueiro em pós-colheita

Os melhores tratamentos obtidos nos experimentos *in vitro*, menta, canela, capim-limão e eucalipto, foram testados sob diferentes metodologias de aplicação em frutos de morangueiro com a finalidade de avaliar a viabilidade de aplicação desses óleos neste tipo de tratamento.

As metodologias empregadas foram: imersão, vaporização e cobertura com biofilme de amido. Para todos os tratamentos, foram empregados 24 frutos por tratamento, sendo três repetições de oito frutos em um delineamento inteiramente casualizado. Os frutos foram obtidos de área orgânica sem a aplicação de nenhum tipo de tratamento fitossanitário. Depois de colhidos, os frutos foram armazenados em recipientes plásticos e em ambiente refrigerado, até o momento de serem aplicados os tratamentos. Amostras foram selecionadas de acordo com a uniformidade de cor, tamanho e ausência de injúrias mecânicas e fisiológicas. Não foi feito nenhum tipo de sanitização dos frutos para a realização do experimento.

Para a imersão foram realizados dois experimentos. Preparadas soluções de óleos essenciais a 0,1% em água destilada em béqueres com a capacidade de 500 mL, na qual os frutos foram imersos e mantidos durante um minuto sob agitação, sendo totalmente cobertos pelo líquido. Antes da imersão os tratamentos eram agitados por dois minutos para que dispersar o óleo na água, visto que nenhum aditivo foi empregado. Após a imersão os frutos foram retirados, secos ao ar ambiente e embalados em cumbucas plásticas.

Para a vaporização os frutos foram acomodados em embalagens plásticas com a colocação de gotas de óleo essencial (20 µL por cumbuca) em papel de filtro afixado na tampa das embalagens (Figura 3) .

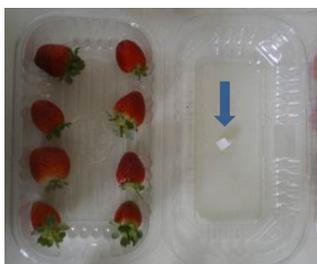


Figura 3 Metodologia da vaporização dos frutos de morangueiro.

Quanto à cobertura com biofilme de amido, os frutos foram imersos em formulação de fécula de mandioca. Essa formulação foi obtida pelo aquecimento sob agitação da suspensão da fécula em água, na concentração de 3% de fécula (material seco).

A suspensão foi colocada em béquer e aquecida à temperatura máxima de 70 °C, com agitação constante, até a geleificação da fécula (15 e 20 min). Nessa suspensão, após resfriada para temperatura ambiente, foram acrescentados os óleos essenciais na concentração de 0,1%, evitando a degradação dos óleos pela temperatura. Após geleificação as suspensões permaneceram em repouso até resfriamento à temperatura ambiente. Os frutos foram imersos durante 3 minutos nessas suspensões e colocados para secar para drenar líquido em condições ambiente. Foram empregadas duas testemunhas, uma coberta pela fécula sem óleo essencial e uma sem aplicação de fécula e sem óleo essencial.

Após a aplicação dos tratamentos os frutos foram acondicionados em embalagens plásticas e avaliadas a incidência de podridões e de mofo cinzento em específico. Os frutos foram obtidos de área com ocorrência da doença garantindo a presença do inóculo inicial.

Com a finalidade de confirmar a cobertura dos frutos pelo amido, dois frutos de cada tratamento foram submetidos à imersão em solução de Lugol (5 g

de iodo I_2 e 10 g de iodeto de potássio KI em 100 mL com água destilada, diluído 10 vezes) (Figura 4).

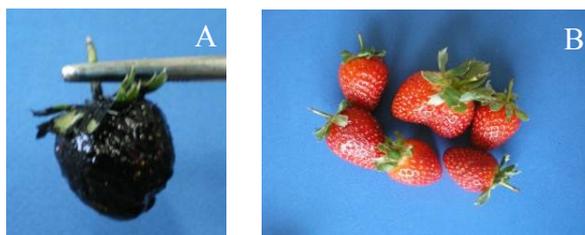


Figura 4 Aplicação de filmes de amido em morangueiro. A – Comprovação da cobertura com o teste com Lugol. B – Frutos recobertos por filme de amido.

Os frutos foram analisados quanto à incidência de mofo cinzento no quarto dia após a aplicação dos tratamentos.

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância, e a comparação das médias será feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação de componentes químicos dos óleos essenciais

Dos 12 óleos essenciais escolhidos para realização do trabalho foram detectados mais de 50 componentes (Tabela 3). Alguns óleos podem apresentar um componente predominante, majoritário, como é o caso de cravo (eugenol), canela (eugenol) e tangerina (limoneno). A presença desses componentes majoritários pode ser responsável pelo efeito fungicida e/ou fungistático dos óleos essenciais. Ou ainda, ter um conjunto de componentes responsáveis por seus efeitos. Óleos essenciais, pelas suas características, apresentam seus componentes em diferentes concentrações, ocorrendo um composto majoritário (cerca de 85% da composição total), e outros em menores quantidades, sendo representados ao todo por cerca de seis componentes (SIMÕES; SPITZER, 2000; BURT, 2004).

Componentes majoritários, como o citral (do óleo essencial de capim-limão, composto pelos isômeros neral e citral) e o eugenol (dos óleos essenciais de cravo e canela), mostraram efeito fungicida semelhante a óleos que possuem em sua composição tais compostos inibindo o crescimento micelial, neste trabalho, dos três patógenos testados, ou seja, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloesporioides* e *C. acutatum* (KISHORE et al., 2007; NERI et al., 2007; COMBRINCK et al., 2011). Contudo, esses componentes majoritários podem apresentar menor atividade em relação ao óleo essencial completo demonstrando a importância do efeito sinérgico dos elementos-traço (MOUREY; CANILLAC, 2002).

Variações nessa composição do óleo essencial podem ser influenciadas ainda pelas condições geográficas/ambientais nas quais a planta se encontra, a sazonalidade de colheita, disponibilidade de água, condições de solo, exposição

à radiação UV, ritmo circadiano, disponibilidade de nutrientes, ataque de patógenos ou herbívoros; alterando a quantidade dos componentes tanto majoritários quanto minoritários, visto que os óleos essenciais são oriundos do metabolismo secundário das plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A partir das análises dos óleos essenciais, neste estudo, com exceção de tangerina e laranja, os óleos que apresentaram destaque para componentes majoritários apresentaram maiores taxas de inibição como será observado nos próximos itens.

Tangerina e laranja, com destaque para o limoneno, não demonstraram controle para os patógenos testados. Limoneno, não apresenta boa atividade fungicida ou fungistática em alguns patossistemas mesmo como composto purificado (ROZWALKA, 2010; COMBRINCK et al., 2011).

A eficácia de outros óleos, que não possuem um componente majoritário, como é o caso de citronela ou mesmo dos elementos-traço dos óleos que o possuem, deve-se ao efeito sinérgico entre os componentes-traço do óleo essencial, levando a efetividade no controle de microrganismos (BURT, 2004; KISHORE et al., 2007; COMBRINCK et al., 2011).

Tabela 3 Porcentagem de área de componentes majoritários de óleos essenciais, separados segundo família botânica, identificados em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu)

Nome vulgar	Nome Científico	Componente Majoritário	2º Componente	3º Componente	4º Componente	5º Componente
Poaceae						
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Geraniol (38,67%)	Neral (32,40%)	Myrceno (13,88%)	Geraniol (2,79%)	Verbenol (1,32%)
Citronela	<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronelal (23,7%)	Geraniol (16,48%)	Oct-7-enol (13,14%)	Elemol (5,14%)	Citronelil isobutirato (4,89%)
Palmarosa	<i>Cymbopogon martini</i>	Geraniol (73,86%)	Geraniol Acetato (27,65%)	Linalol (12,14%)	E - β -Ocimene (3,77%)	α -Himachalene (1,46%)
Myrtaceae						
Eucalipto	<i>Corymbia citriodora</i>	Citronelal (30,45%)	Oct-7-enol (15,23%)	Isopulegol (13,83%)	Fenchyl acetato (8,43%)	Eucaliptol (2,71%)
Melaleuca	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Terpinen-4-ol (26,64%)	γ terpineno (8,81%)	Eucaliptol (5,67%)	α terpineno (6,07%)	Cimeno (5,45%)
Cravo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol (77,81%)	α humuleno (14,56%)	δ cadineno (3,03%)	Óxido Cariofileno (1,43%)	
Lauraceae						
Canela	<i>Cinnamomum zeilanicum</i>	Eugenol (53,38%)	α himachaleno (9,44%)	Biciclogermacreno (7,61%)	Linalol (3,47%)	Nerolidol (3,08%)
Lamiaceae						
Menta	<i>Mentha pipertita</i>	Mentol (38,14%)	Mentona (36,96%)	Menthyl acetato (7,17%)	α Himachaleno (5,36%)	Eucaliptol (4,96%)
Lavanda	<i>Lavandula hybrida</i>	Octil Acetato (21,00%)	Linalol (15,03%)	Isobornil acetato (11,26%)	Canfora (11,16%)	α Himachaleno (6,86%)
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Eucaliptol (27,25%)	Canfora (21,21%)	Pineno (16,68%)	Canfeno (9,89%)	α terpineol (4,30%)
Rutaceae						
Tangerina	<i>Citrus nobilis</i> var. <i>tangerinae</i>	Limoneno (97,02%)	Mirceno (1,50%)	Pineno (0,34%)		
Laranja	<i>Citrus sinensis</i> var. <i>dulcis</i>	Limoneno (94,13%)	Mirceno (3,50%)	Pineno (0,68%)	Caprialdeído (0,59%)	Sabineno (0,47%)

4.2 Sensibilidade de isolados de *Botrytis cinerea* a fungicidas

Nos testes *in vitro* com o fungicida benzimidazol, tiofanato metílico, o isolado de CM 2065, originário de Lavras - MG, demonstrou diferenças significativas, testado a partir de 500 ppm já apresentava redução de 50% do crescimento micelial, a partir de 1000 ppm não havia mais crescimento do fungo.

Para o isolado CM 2066, originário de Tocos do Moji- MG, houve diferenças significativas, em todas as concentrações empregadas houve crescimento micelial, em 4000 ppm, aproximadamente quatro vezes a dose recomendada, a redução do crescimento micelial foi mínima (Figura 5). Caracterizando resistência a esse princípio ativo.

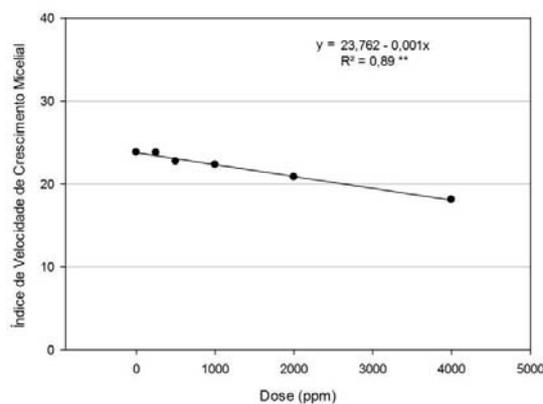


Figura 5 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial do isolado CM 2066, originário de Tocos do Moji- MG de *B. cinerea* sob ação do fungicida à base de tiofanato metílico.

As reações dos isolados foram diferentes diante à aplicação dos fungicidas, havendo diferenças significativas. Todos os fungicidas empregados apresentaram diferenças significativas exceto tiofanato metílico empregado sobre o isolado CM 2066.

Para o isolado CM 2065 houve diferenças significativas. Sendo os fungicidas à base de tiofanato metílico, fluazinan e azoxistrobina + ciproconazole (Az+Cp) inibiram o crescimento do patógeno. Procimidona no dobro da dose apresentou 88% e na dose recomendada 55% de redução do crescimento micelial. O fungicida à base de cobre apesar de diferir da testemunha apresentou apenas 17% (dose recomendada) e 20% (dobro da dose) de redução do crescimento do patógeno (Figura 6).

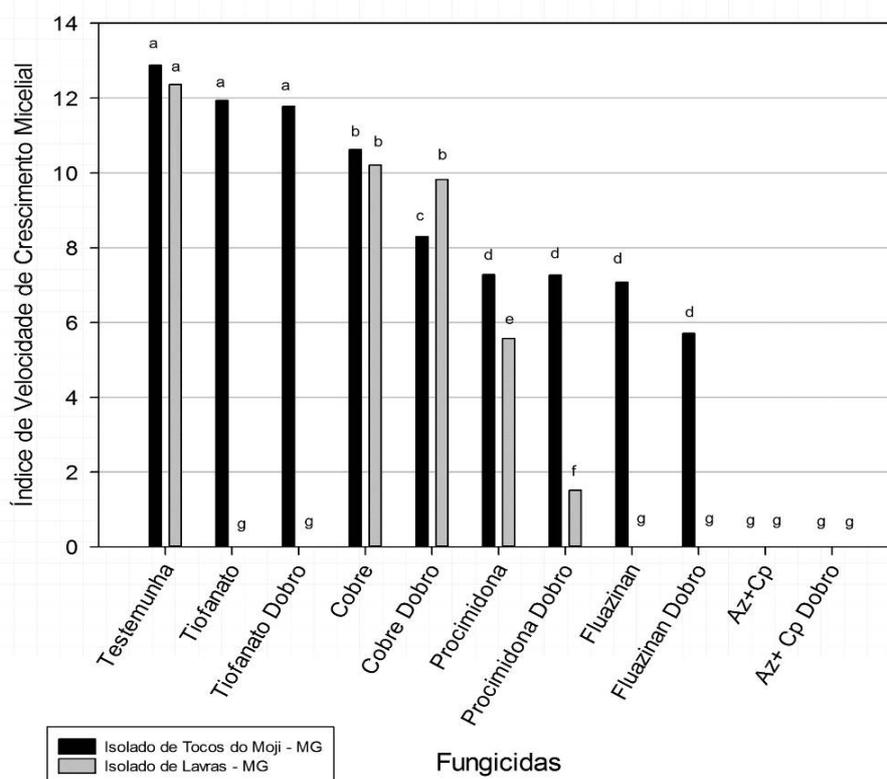


Figura 6 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *B. cinerea* sob ação de fungicidas. Barras para cada efeito, com letras minúsculas distintas diferem pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Para o isolado CM 2066 de Tocos do Moji – MG, apenas o fungicida composto (estrobirulina e triazol), em ambas as doses, inibiu completamente o crescimento micelial do patógeno. Apesar de quinze dias após a última avaliação do experimento algum crescimento foi observado no disco de micélio inicial, contudo, não sendo possível mensurar. Houve crescimento do patógeno em todos os outros fungicidas empregados diferindo estatisticamente da testemunha, exceto para o tiofanato metílico, que foi semelhante à testemunha, reduzindo 7% (dose) e 9% (dobro da dose recomendada) o crescimento do patógeno. Cobre na dose recomendada e no dobro da dose reduziram em 17 e 36% do crescimento do patógeno. A procimidona nas duas doses reduziu em 46% e fluazinam na dose recomendada 45%, no dobro da dose 56% do crescimento micelial. Dessa forma, para o isolado resistente foi necessário a mistura de fungicidas para o controle *in vitro*.

Por volta dos anos 70 do século passado, iniciaram-se os relatos de isolados de *B. cinerea* resistentes ao benomil no Reino Unido (JORDAN; RICHMOND, 1974). Washington et al. (1992) observaram na Austrália isolados resistentes a benomil, iprodione e dichlofluanid em morangueiro. Na Alemanha, Weber (2011) testou 353 isolados de *B. cinerea* de várias pequenas frutas, dentre elas o morango, em relação à resistência a fungicidas; 40,53% apresentaram resistência a tiofanato metílico, 76,8% a trifloxystrobin e 64% a iprodione.

No Brasil há casos de resistência de *B. cinerea* citada para eucalipto (ALFENAS et al., 1999; SILVA; COELHO, 2003). Em relação a isolados de *B. cinerea* de morangueiro e resistência a fungicidas não foram encontrados relatos, apesar de serem citados por produtores.

Pela avaliação dos isolados com os fungicidas notou-se a necessidade de alteração das formas de manejo para a cultura, com o registro de novos produtos visando uma rotação de fungicidas, estratégia de controle da resistência de

fungos; além da adoção de práticas preventivas, como a erradicação de restos culturais.

4.3 Experimentos *in vitro*

Os resultados dos experimentos *in vitro* são demonstrados a seguir.

4.3.1 Bioatividade de óleos essenciais no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Colletotrichum acutatum*

Para *Botrytis cinerea*, a análise do fatorial demonstrou interação significativa entre as concentrações e os tratamentos, sendo que a maior concentração apresentou ação superior em relação a menor concentração, quanto aos tratamentos houve diferenças significativas entre eles (Figura 7).

Para a menor concentração, os óleos essenciais de tangerina, alecrim, laranja, lavanda e eucalipto não apresentaram diferenças significativas em relação à testemunha com redução do crescimento micelial de 5, 5, 7, 8 e 8%, respectivamente. Os óleos de melaleuca, menta e citronela reduziram em 10, 13, 13% respectivamente, o crescimento micelial do patógeno, diferindo do grupo da testemunha e dos óleos de cravo, palmarosa e canela. Esses óleos apresentaram 28, 31 e 41% de redução do crescimento micelial de *B. cinerea*, diferindo dos demais tratamentos.

Para a maior concentração, testemunha, tangerina, laranja, alecrim não diferiram significativamente. Lavanda apresentou redução do crescimento micelial de 15%; melaleuca, 48%; cravo, 65%; citronela, 80%; palmarosa, 85% todos diferindo entre si, da testemunha e dos óleos de eucalipto, menta, canela e capim-limão. Dentre esses óleos, capim-limão e canela inibiram completamente o crescimento micelial do patógeno enquanto eucalipto e menta reduziram 91% e 97% do crescimento micelial.

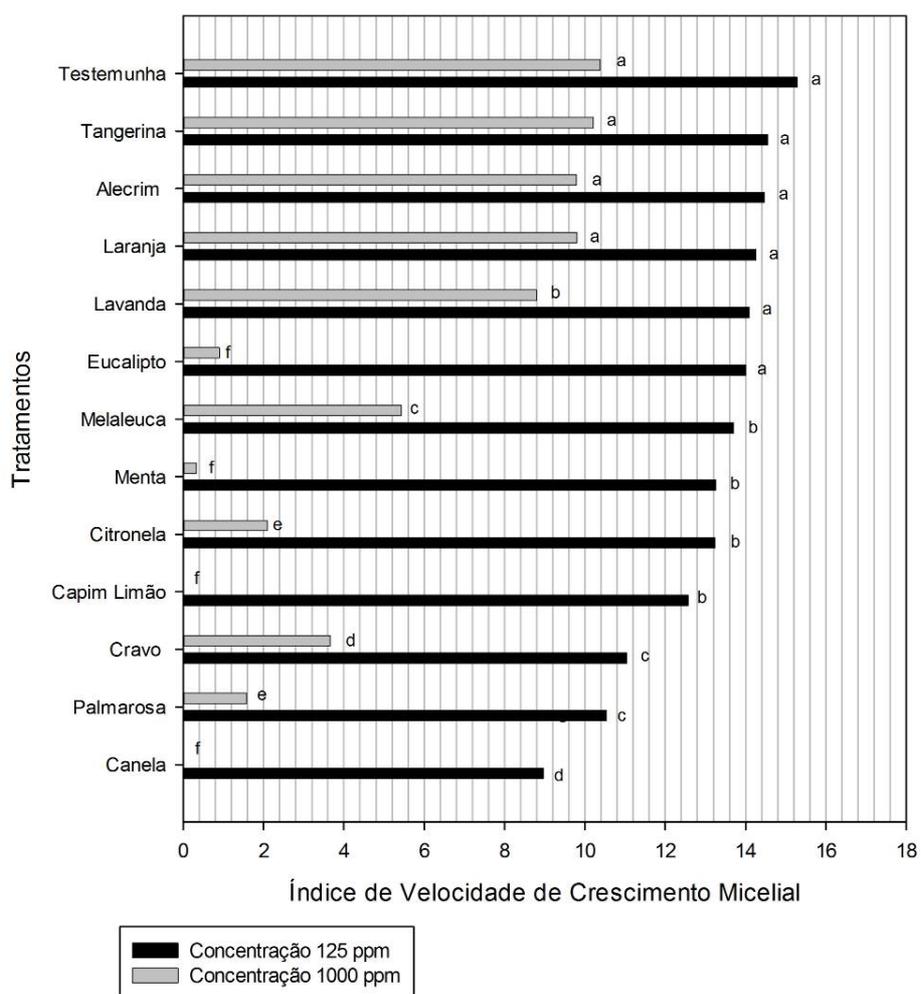


Figura 7 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Botrytis cinerea* sob ação de óleos essenciais em duas concentrações. Barras para cada efeito, com letras minúsculas distintas diferem pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Para *C. gloesporioides*, também foi observada interação significativa entre as concentrações e os tratamentos, sendo que a maior concentração apresentou melhores resultados, reduzindo o crescimento micelial do patógeno (Figura 8).

Analisando por fator, na menor concentração de 200 ppm, todos os óleos essenciais apresentaram diferenças significativas em relação à testemunha, contudo, o que apresentou o melhor resultado foi o óleo de canela com 54% de redução do crescimento micelial. Capim-limão, cravo e eucalipto apresentaram redução de 31, 43 e 35% de redução do crescimento micelial, respectivamente, diferindo da testemunha do óleo de canela e dos demais óleos. Os outros óleos apresentaram valores intermediários em relação ao crescimento micelial, com valores que variaram de 16 a 26%.

Na maior concentração empregada (1000 ppm), novamente todos os óleos mostraram eficiência em relação à testemunha, diferindo estatisticamente. Cravo, capim-limão, canela e palmarosa, inibiram completamente o crescimento do patógeno (100%). Os óleos de citronela, eucalipto e menta reduziram em 83, 71 e 60% o crescimento micelial, respectivamente. Os demais óleos apesar de diferirem da testemunha apresentaram valores intermediários em relação ao crescimento micelial.

Para *C. acutatum* (Figura 9), novamente, houve interação significativa das concentrações com os tratamentos, prevalecendo os melhores resultados para redução do crescimento micelial para a concentração de 1000ppm.

Na análise por fator, para a menor concentração (200 ppm) apenas os óleos essenciais de citronela, palmarosa, cravo, canela e capim-limão promoveram redução do crescimento micelial do patógeno, com destaque para os óleos essenciais de cravo e canela, que reduziram 33 e 53% o crescimento micelial do patógeno.

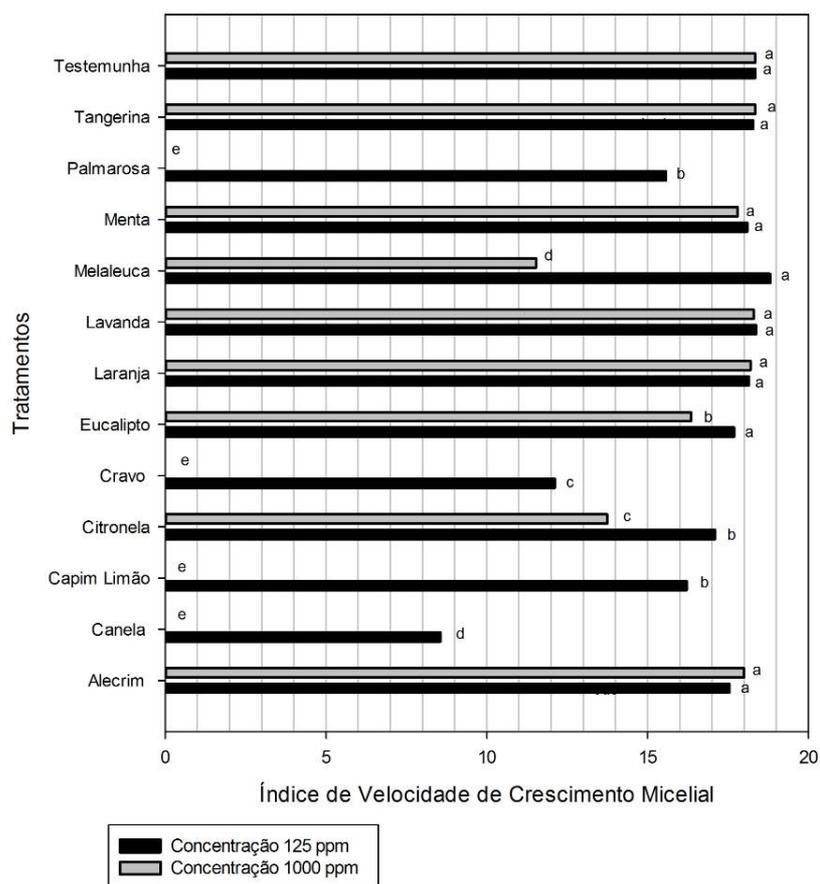


Figura 8 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Colletotrichum acutatum* sob ação de óleos essenciais em duas concentrações. Barras para cada efeito, com letras minúsculas distintas diferem pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

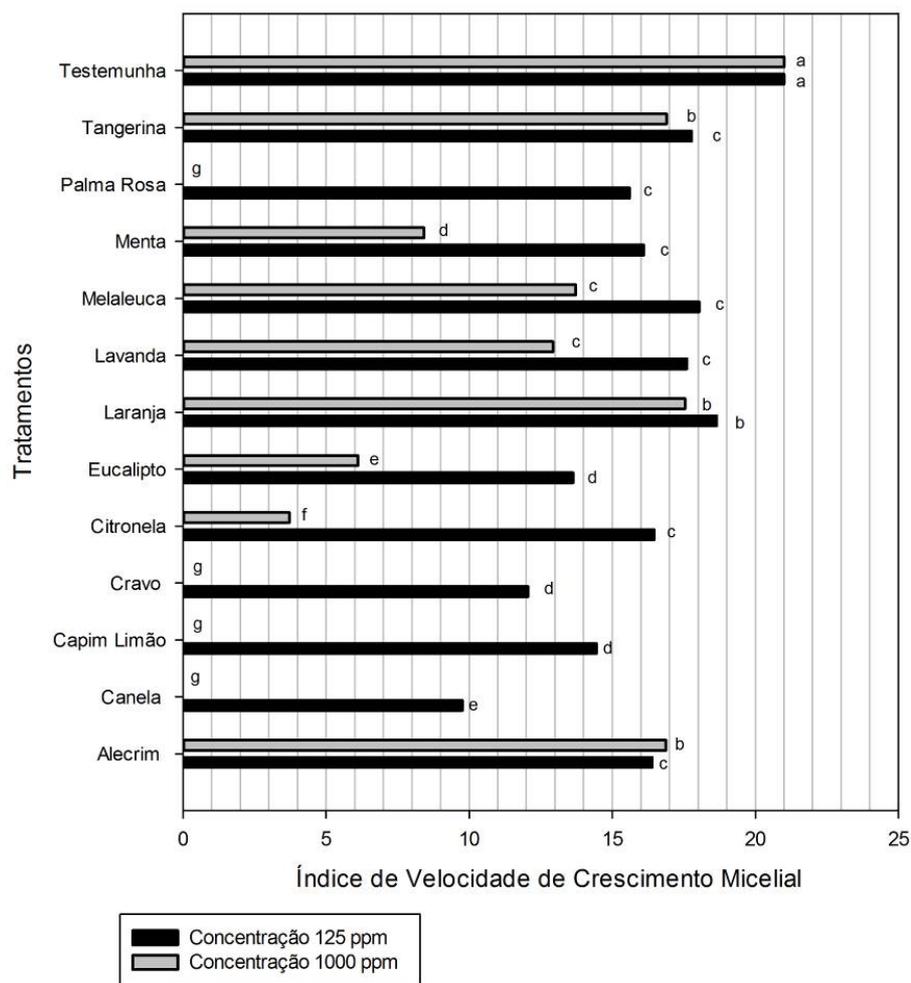


Figura 9 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Colletotrichum gloesporioides* sob ação de óleos essenciais em duas concentrações. Barras para cada efeito, com letras minúsculas distintas diferem pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Para a maior concentração (1000 ppm), os óleos de capim-limão, cravo, citronela, canela e palmarosa mostraram inibição do crescimento micelial desse patógeno. Melaleuca, citronela e eucalipto reduziram em 37, 25 e 10% o crescimento micelial do patógeno em relação à testemunha. Os demais óleos testados não diferiram do crescimento do patógeno.

Dos óleos testados, vários óleos já apresentam atividade comprovada, dentre eles os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (L.) (canela) e *Syzygium aromaticum* (L.) (cravo) demonstraram efeito fungicida sobre crescimento micelial de *C. musae*, agente etiológico da antracnose em banana e *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium proliferatum*, agentes etiológicos da podridão-da-coroa (RANASINGHE et al., 2002).

Os óleos essenciais utilizados nos experimentos de capim-limão e palmarosa pertencentes à mesma família botânica – *Poaceae* apresentam-se como constituintes monoterpênicos semelhantes e com relatos de controle de *B. cinerea* em outros patossistemas. Seus componentes majoritários, geraniol e citral, encontrados na prospecção química, são candidatos à expressiva ação apresentada neste trabalho. Nesse contexto, Garcia et al. (2008) relatam a importante ação fungicida do citral e outros monoterpênicos em relação à *C. gloesporioides* e *C. musae*. Outra ação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* L.) foi comprovada no patossistema maracujá e *C. gloesporioides*, agente causal da antracnose do maracujazeiro, no qual o óleo mostrou-se eficiente em testes *in vitro*, apresentando ainda a vantagem de ser obtido de uma planta bem adaptada às condições de cultivo brasileiras e de fácil obtenção (ANARUMA et al., 2010).

O óleo essencial de eucalipto em ensaios *in vitro* mostrou-se eficiente no controle de *C. acutatum* do morangueiro, contudo, não apresentou resultados satisfatórios quando testado em vasos em condições de casa de vegetação (DIAS – ARIEIRA et al., 2010).

Wilson et al. (1997) testaram contra *Botrytis cinerea* a ação antifúngica de 345 extratos de plantas e 49 óleos essenciais. De todos os óleos testados os de palmarosa (*Cymbopogon martini*), tomilho (*Thymus zygis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e cravo (*Syzygium aromaticum*) apresentaram melhores resultados na inibição do fungo. Esses resultados reafirmam os resultados deste trabalho com os mesmos óleos de palmarosa, canela e cravo.

4.3.2 Produção de esporos e germinação de conídios de *Botrytis cinerea*

Em relação à produção de conídios de *B. cinerea* sobre ação de óleos essenciais houve diferenças significativas, capim-limão, palmarosa, menta, eucalipto, cravo, canela inibiram completamente a esporulação do fungo (Tabela 4). Apesar de apresentar crescimento micelial, exceto para capim-limão e palmarosa, o patógeno não produziu esporos no período avaliado. O aumento no tempo para produção de estruturas reprodutivas (esporos) é favorável para o controle de doenças (AGRIOS, 2005).

Alecrim, melaleuca e lavanda estimularam a esporulação do fungo, principalmente alecrim, aumentando em 21, 54 e 230% em relação à testemunha. Alecrim não inibiu o crescimento micelial em relação à testemunha, enquanto lavanda apresentou redução de 15,22% e melaleuca de 48% do crescimento micelial. Apesar da redução no crescimento micelial demonstrada por esses óleos os mesmos estimularam a esporulação, não sendo apropriados em estratégias de controle no caso desse patógeno.

Kadoglidou et al. (2011) testando os óleos de lavanda (*Lavandula stoechas*), orégano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*), sálvia (*Salvia fruticosa*) e menta (*Mentha spicata*) e monoterpênicos isolados desses óleos sobre os patógenos de solo *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum* e *Verticillium dahliae*, demonstraram diferenças em relação à

esporulação entre os compostos testados, sendo que alguns estimularam e outros inibiram a esporulação dos patógenos, com observado neste trabalho.

Tabela 4 Produção e porcentagem de germinação de conídios de *Botrytis cinerea* sob ação de óleos essenciais

Tratamento	Produção de Conídios (x10 ⁶) ¹	Germinação (%)
Canela	0 e *	0 c
Capim-limão	0 e	0 c
Cravo	0 e	0 c
Eucalipto	0 e	0,5 c
Menta	0 e	0 c
Palmarosa	0 e	0,5 c
Citronela	88,5 d	1,5 c
Laranja	100,75 cd	98,5 ab
Tangerina	105,5 cd	100 a
Testemunha	113,75 cd	100 a
Alecrim	137,5 bc	97 b
Melaleuca	175,75 b	1,5 c
Lavanda	377,5 a	97 b
cv(%)	9,10	2,87

* Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ¹Dados transformados para \sqrt{x}

O óleo de lavanda foi também menos eficiente quando testado contra *Trichoderma harzianum* causador de mofo verde em cogumelos, se comparados aos óleos de érika (*Leptospermum scoparium*), menta e coentro. Esse óleo não apresentou inibição do crescimento micelial e reduziu de 50 a 80% a esporulação enquanto o óleo de érika inibiu 99% da esporulação do patógeno (GÓRSKI et al., 2010).

Em relação à germinação, houve diferenças significativas entre os óleos essenciais testados. Os óleos de canela, capim-limão, cravo, eucalipto, menta, palmarosa, citronela e melaleuca inibiram significativamente a porcentagem de

germinação dos conídios de *B. cinerea*. Tangerina e a testemunha apresentaram 100% de germinação não diferindo de laranja. Alecrim e lavanda apresentaram 97% de germinação dos conídios, diferindo dos demais tratamentos.

O óleo essencial de melaleuca apesar de estimular a produção inibiu significativamente a germinação de conídios, enquanto alecrim e lavanda além de estimularem a produção de conídios não reduziram a germinação desses, demonstrando novamente que não apresenta potencial como biocontroladores para o caso desse patógeno.

Assim como observado no trabalho, o óleo de cravo mostrou ação antifúngica contra fungos isolados de banana, *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium proliferatum* (RANASHINGE et al, 2002). Para este trabalho, o óleo de cravo mostrou eficiente efeito na redução da germinação de conídios, e assim como canela, possui como principal constituinte o eugenol.

Outro óleo que possui importantes registros de sua ação fungicida é capim-limão. Nguetack et al. (2004) avaliando o efeito do óleo essencial de capim-limão no crescimento micelial de fungos, observaram a redução de 64% do crescimento de *Fusarium moniliforme* na concentração de 200 ppm, *Aspergillus flavus* em 48% e *Aspergillus fumigatus* em 77% na concentração de 500 ppm, além de inibição total em 300 ppm para *F. moniliforme* e 1200 ppm para *A. flavus* e *A. fumigatus*.

Em outro patossistema, óleos essenciais de canela, capim-limão, cravo, eucalipto, melaleuca e menta apresentaram controle eficiente de *Alternaria solani*, agente etiológico da pinta-preta do tomateiro, tanto em condições *in vitro* como em condições de campo (ABREU, 2006). Excetuando os óleos de melaleuca, todos esses óleos apresentaram boa eficiência no caso do mofo cinzento. Em trabalho com patógenos de pós-colheita em citrus, o óleo essencial de menta na concentração de 1000 mg.L⁻¹, inibiu em 36,8% e 59,44% o

crescimento micelial de *Penicillium italicum* e *Alternaria citri* respectivamente (AZIZI et al., 2008).

4.3.3 Bioatividade de componentes voláteis de óleos essenciais no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

Quanto aos componentes voláteis, houve diferenças significativas entre os tratamentos. O óleo essencial de capim-limão apresentou 100% de inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* (Figura 10). Canela, melaleuca, menta, eucalipto, cravo e palmarosa apresentaram de 80 a 59% de controle em relação à testemunha. Citronela e lavanda reduziram em 44 e 41% o crescimento micelial, diferindo dos demais tratamentos. Tangerina e laranja reduziram em 23 e 24%, diferindo da testemunha. O crescimento micelial de alecrim, apesar de maior que todos os tratamentos, não diferiu estatisticamente da testemunha.

Alguns trabalhos empregando componentes voláteis de óleos essenciais demonstram efeito inibitório sobre diversos patógenos. Voláteis de óleos de tomilho, orégano e capim-limão mostraram inibição total do crescimento de *Botrytis cinerea* e *Alternaria arborescens* patogênicos para o tomateiro (PLOTTO et al., 2003). Os compostos voláteis *trans*-2-hexenal, carvacrol, *trans*-cinamaldeído e citral (componente do óleo de capim-limão) apresentam expressiva atividade antifúngica sobre o crescimento micelial, germinação e esporulação de *Penicillium expansum* (NERI et al., 2006). Componentes voláteis do óleo essencial de capim-limão proporcionaram redução significativa no crescimento das colônias de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*, entre 25 e 500 ppm (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007).

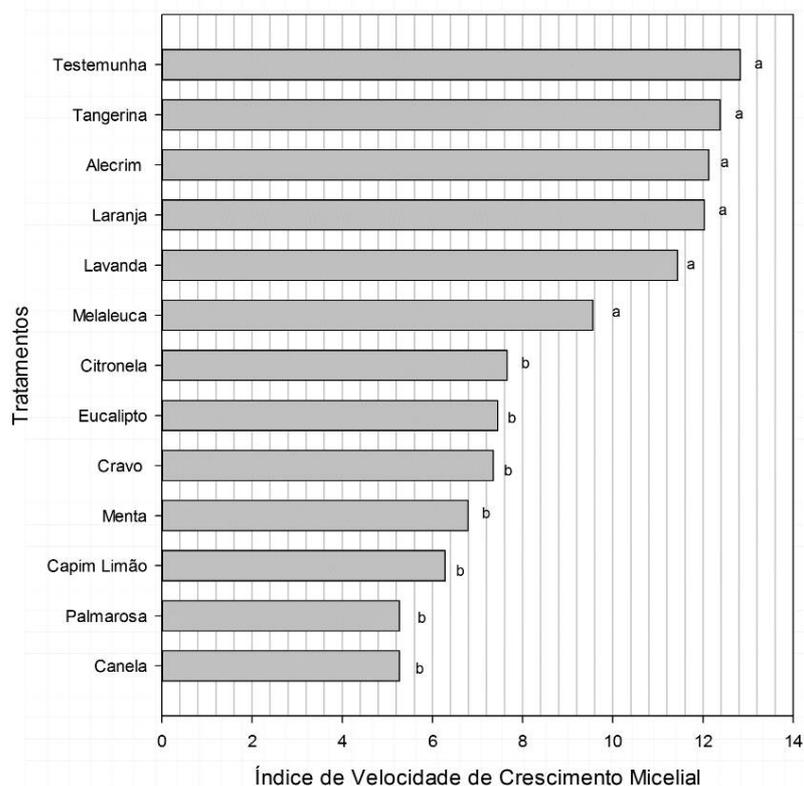


Figura 10 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *Botrytis cinerea* sob ação de componentes voláteis de óleos essenciais em duas concentrações. Barras para cada efeito, com letras minúsculas distintas diferem pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

4.3.4 Manejo de resistência de *Botrytis cinerea* com óleos essenciais

Quanto ao isolado resistente a tiofanato metílico (CM 2066), os óleos essenciais testados de capim-limão e canela na dose de 1000 ppm demonstraram diferenças significativas, inibindo o crescimento micelial do patógeno. O óleo de

canela demonstrou resultados diferentes para o outro experimento, evidenciando novamente diferenças quanto ao isolado (Figura 11).

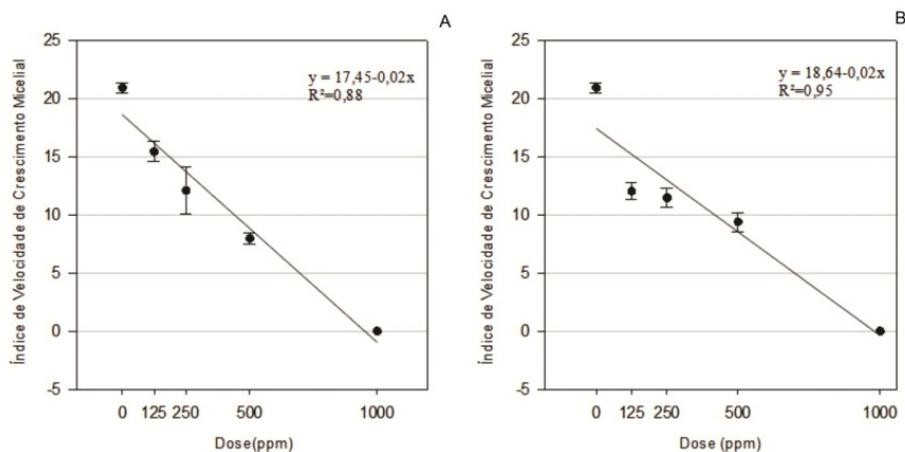


Figura 11 Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *B. cinerea* sob ação dos óleos essenciais de canela (A) e capim-limão (B) em diferentes concentrações.

Botrytis cinerea apresenta alto risco quanto à resistência a fungicidas (MYRESIOTIS et al., 2007), apresentando-se como sério problema em áreas produtoras, pela questão da resistência de isolados quanto pela falta de princípios ativos registrados para uma rotação (apenas dois químicos e dois biológicos – Agrofit, 2011). Assim, os óleos essenciais constituem-se de novas alternativas para o manejo de doenças nos casos de resistência de fungos a fungicidas (CHANG et al., 2008).

Além disso, os óleos essenciais possuem baixa toxicidade em mamíferos, são biodegradáveis, não persistentes no ambiente, apresentam relativo baixo custo de produção, além de serem fungicidas apresentam atividade inseticida (ISMAN, 2000).

A identificação de componentes oriundos do metabolismo secundário de plantas, presentes em óleos essenciais, que apresentam efeito no controle de doenças, torna-se uma ferramenta auxiliar para indústria química quanto à prospecção de novos produtos. Igualmente, com o avanço da agricultura orgânica e as exigências do mercado consumidor por produtos oriundos de práticas agrícolas menos agressivas os óleos essenciais prestam-se a atender essa demanda, fornecendo subsídios para o manejo de doenças quando necessário.

4.3.5 Antagonismo de *Trichoderma* spp. à *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*

Com os testes realizados *in vitro*, alguns isolados mostraram efeito promissor no controle dos patógenos do morangueiro.

Para *Botrytis cinerea* quando em cultivo pareado com os antagonistas não foi observado nenhum halo de inibição. Os isolados de *Trichoderma* também não reduziram significativamente o crescimento do patógeno em relação à testemunha. Contudo, após dez dias do crescimento do antagonista este se desenvolveu sobre o patógeno nos isolados T5 e T6.

Para *Colletotrichum acutatum* todos os isolados dos antagonistas reduziram o crescimento do patógeno em relação à testemunha, apresentando diferenças significativas. Os isolados T5 e T6 apresentaram maior ação antagonista, reduzindo em cerca de 70% o crescimento do patógeno. Os isolados T1, T2, T3 e T4 reduziram o crescimento micelial em relação à testemunha, contudo diferindo de T5 e T6. Houve presença de halo de inibição nos tratamentos T1, T2 e T4 (Figura 12). A presença de halos de inibição em cultivo pareado demonstrou os melhores antagonistas em relação à *Verticilium* na cultura da berinjela (MELO; COSTA, 1987), o que não foi observado para o teste de crescimento pareado.

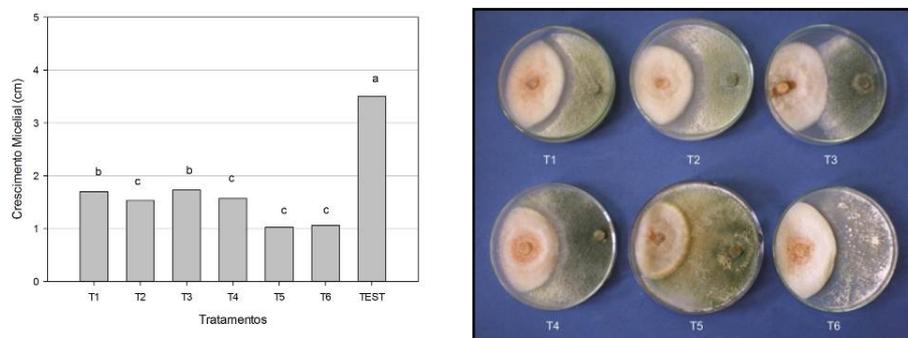


Figura 12 Crescimento pareado de *Colletotrichum acutatum* e *Trichoderma* spp. Isolados T1 – área orgânica, T2- área convencional, T3 – *Trichoderma virens*, T4 – *Trichoderma harzianum*, T5 – lavoura comercial e T6 - floresta nativa.

Em trabalho com isolados de *Trichoderma* spp. em cultivo pareado com o fitopatôgeno do sorgo *Colletotrichum graminicola* foram observadas as mesmas zonas de inibição para *T. harzianum*, mesma espécie do isolado T4, e *T. viride* (MICHEREFF et al., 1993). A mesma espécie de antagonista também promoveu redução de crescimento micelial quando confrontada com *Rhizopus stolonifer*, isolado da cultura do maracujazeiro (BONFIN et al., 2010). A ação dessa espécie de *Trichoderma* pode estar relacionada à presença de antibióticos, como é o caso do composto 5,6-dimetoxi-3-(2-metil-1-oxohex-4-enyl)-2-piridona, nomeado harzianopiridona, eficiente contra uma ampla gama de fungos fitopatogênicos (CLAYDON et al., 1987).

O isolado T5 apresentou modificação da coloração do meio de cultura, provavelmente pela liberação de metabólitos, tornando o meio de cultura amarelo escuro, bem diferente em relação aos outros isolados.

A menor ação antagônica observada para os isolados T1, T2, T3 e T4 pode ser resultante de uma maior competição por nutrientes presentes no meio de cultura.

Nos testes de antibiose, quanto aos metabólitos não voláteis, para *B. cinerea* o isolado T3 (*T. virens*) inibiu completamente (100%) o crescimento do patógeno. O isolado T6 também apresentou inibição de 37% do patógeno. T1 reduziu em apenas 3% o crescimento micelial do patógeno, contudo, diferindo também da testemunha. Os demais isolados (T2, T4 e T5) não reduziram o crescimento micelial do patógeno em relação à testemunha (Figura 13).

Para *C. acutatum*, ainda no teste de antibiose, os resultados foram semelhantes, tendo os isolados T3 (47% de inibição), T6 (49% de inibição), T5 (32% de inibição) e T2 (29% de inibição) maior produção de metabólitos capazes de interferir no crescimento do patógeno, diferindo dos isolados T1, T4 e da testemunha (Figura 13).

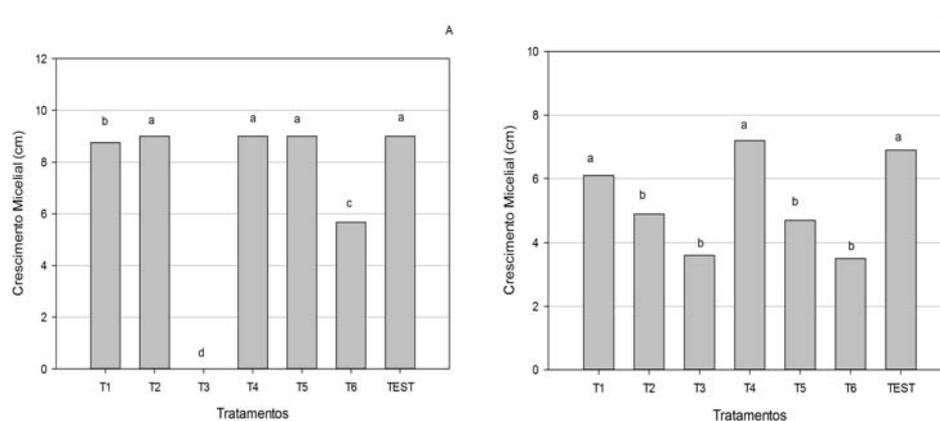


Figura 13 Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* (A) e *Colletotrichum acutatum* (B) em presença de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. Lavras. . Isolados T1 – área orgânica, T2- área convencional, T3 – *Trichoderma virens*, T4 – *Trichoderma harzianum*, T5 – lavoura comercial e T6 - floresta nativa.

Para os metabólitos voláteis, exceto para os isolados T1 e T2, todos os isolados (T3, T4, T5 e T6) apresentaram inibição do crescimento para *C. acutatum* (39, 53, 52 e 43% de inibição, respectivamente) (Figura 14). Para *B.*

cinerea não houve diferença significativa entre o crescimento micelial dos isolados em presença dos metabólitos voláteis.

Nos testes de antibiose observaram-se diferenças quanto à produção de metabólitos em relação aos diferentes isolados, conforme já citado para o gênero *Trichoderma*. Papavizas (1985) afirma que a capacidade para produzir metabólitos com efeito fungicida varia entre espécies e até mesmo entre isolados da mesma espécie.

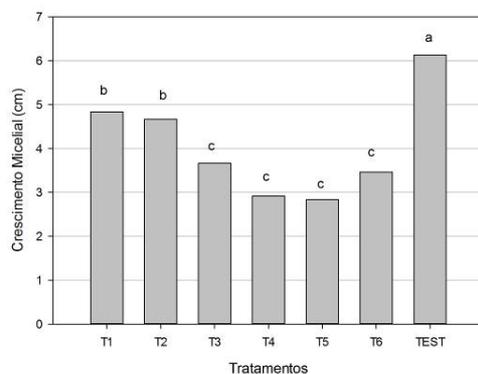


Figura 14 Crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* em presença de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. Lavras. Isolados T1 – área orgânica, T2- área convencional, T3 – *Trichoderma virens*, T4 – *Trichoderma harzianum*, T5 – lavoura comercial e T6 - floresta nativa.

Em relação aos metabólitos termoestáveis, para *C. acutatum* não houve diferenças significativas entre os isolados. Para *B. cinerea*, T1, T2, T5 e T6 apresentaram redução do crescimento micelial em relação à testemunha. Os tratamentos T3 e T4 não apresentaram redução do crescimento micelial, sendo semelhantes a testemunha apenas com a presença do meio de cultura (Figura 15).

A inibição do crescimento micelial dos patógenos pela presença de metabólitos liberados pelos antagonistas foi citada por Bell et al. (1982); Camporota (1985); Claydon et al., (1987); Macedo et al. (2007); Bonfim et al.

(2010). Esses autores sugerem que espécies de *Trichoderma* produzem metabólitos voláteis capazes de inibir o crescimento micelial de uma ampla gama de fitopatógenos. Redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise são efeitos atribuídos aos antibióticos (CAMPBELL, 1989).

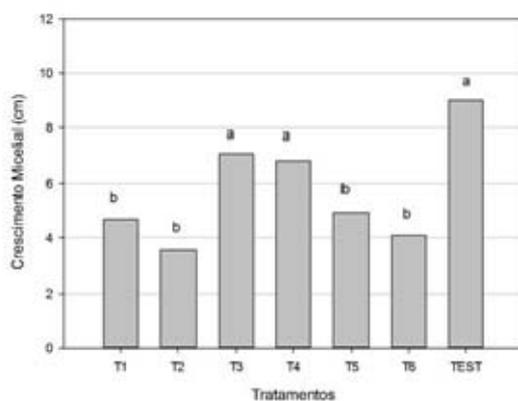


Figura 15 Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em presença de metabólitos termoestáveis de *Trichoderma* spp. * Isolados T1 – área orgânica, T2- área convencional, T3 – *Trichoderma virens*, T4 – *Trichoderma harzianum*, T5 – lavoura comercial e T6 - floresta nativa.

No teste utilizado para analisar o hiperparasitismo do antagonista pela interação microscópica de hifas, houve envolvimento e sobreposição das hifas de todos os isolados de *Trichoderma* com as de *B. cinerea*. Todos os isolados testados interagiram com o patógeno. Hifas mais finas do antagonista enrolavam-se promovendo o estrangulamento das hifas mais grossas do patógeno (Figura 16). Isolados de *Trichoderma* em ensaio com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* demonstraram resultados semelhantes, as hifas mais finas do antagonista envolveram e desenvolveram-se sobre toda a superfície das hifas mais grossas do patógeno (OLIVEIRA et al., 2008).

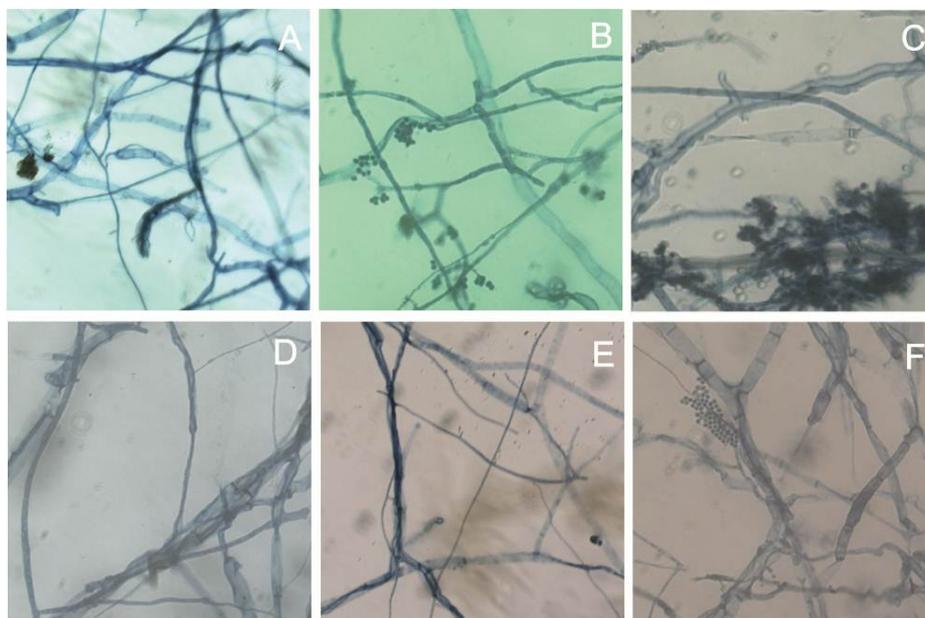


Figura 16 Teste de hiperparasitismo de *B. cinerea* versus *Trichoderma* spp. * A – área orgânica, B - área convencional, C – *Trichoderma virens*, D – *Trichoderma harzianum*, E – lavoura comercial e F - floresta nativa.

Santos et al. (2008) também verificaram sobreposição e enrolamento das hifas de isolados de *Trichoderma* em vários patógeno, como *Colletotrichum* e *Rhizoctonia solani*. Louzada et al. (2009) observaram diferenças entre isolados de *Trichoderma* em relação ao hiperparasitismo, alguns apresentaram resultados positivos, semelhantes aos obtidos neste trabalho com o enrolamento das hifas do patógeno, outros não interagem com o patógeno, sugerindo a existência de diferentes mecanismos de antagonismo como antibiose.

Para *C. acutatum*, apenas o isolado T2 apresentou indícios de interação de hifas com o antagonista. Apesar do crescimento das hifas do patógeno e do antagonista ser observado, em nenhum dos tratamentos houve sobreposição tal qual observado para o outro patógeno.

A realização de testes *in vitro* servem como indicio para testes em campo (ETHUR et al., 2001), dessa forma, diante de todos os testes realizados, os isolados T5 (isolado de lavoura comercial), T3 (*T. virens*) e T6 (isolado de floresta nativa) apresentaram os melhores resultados devendo ser testados em casa de vegetação e em campo posteriormente.

4.4 Testes *in vivo* para o controle de mofo cinzento do morangueiro

Quanto aos testes *in vivo*, com folhas recortadas de morangueiro, houve diferenças significativas. Os óleos de melaleuca, eucalipto, cravo e canela, apresentaram redução da incidência de *B. cinerea* quando a aplicação do óleo foi realizada antes da inoculação do patógeno, ou seja, em aplicação preventiva. Cravo e canela, bem como o padrão químico fungicida, inibiram completamente o crescimento do patógeno, enquanto eucalipto demonstrou uma redução de 20% de incidência e eucalipto 10% (Figura 17).

Quando patógeno e óleo essencial foram aplicados ao mesmo tempo canela e cravo, mantiveram os resultados, inibindo completamente o crescimento do patógeno e igualando-se ao padrão químico, representado pelo fungicida adotado. O óleo de palmarosa apresentou 97% de redução da incidência, seguido por 66% de redução do óleo de melaleuca e 33% do óleo de capim-limão.

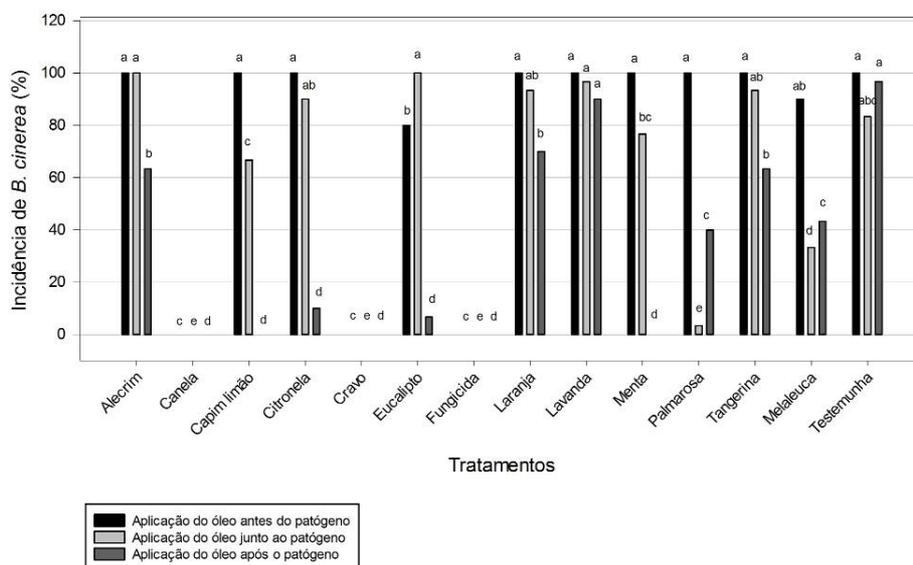


Figura 17 Incidência de *B. cinerea* em folhas recortadas de morangueiro sob a ação de óleos essenciais. * Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Quando o óleo foi aplicado após a inoculação do patógeno, de forma curativa, os óleos de canela, capim-limão, cravo e menta impediram o crescimento do patógeno, de maneira semelhante ao observado para o fungicida. Eucalipto reduziu em 93% a incidência do patógeno, citronela em 90% e palmarosa e melaleuca em torno de 60% a incidência do patógeno. A aplicação dos óleos essenciais posteriormente ao patógeno atuou inibindo sua germinação ou ainda atuado nos eventos iniciais de crescimento dos esporos do patógeno, impedindo seu crescimento sobre as folhas do morangueiro.

A metodologia utilizando folhas destacadas e meios de cultura diferentes mostrou-se eficiente para os testes com óleos essenciais, visto que foi adaptada de ensaios com agentes de controle biológico (MORANDI et al., 2007).

Este estudo sugere a ação dos óleos essenciais de forma curativa, mais do que como preventivo, exceto para os óleos de cravo e canela. Não foram

encontrados outros trabalhos para comparação desses resultados com o uso de óleos essenciais.

A ação curativa também está relacionada com um dos maiores inconvenientes no uso de óleos essenciais na agricultura, ou seja, sua instabilidade química na presença do ar, luz, outras misturas e temperaturas altas, levando a rápida evaporação e degradação de componentes (PILLMOOR, et al., 1993). O encapsulamento do óleo essencial em nanopartículas mostra-se como opção para elaboração de formulações (LAI et al., 2006).

4.5 Óleos essenciais no controle de patógenos do morangueiro em campo

A pluviosidade apresentada na área experimental é demonstrada na figura 18.

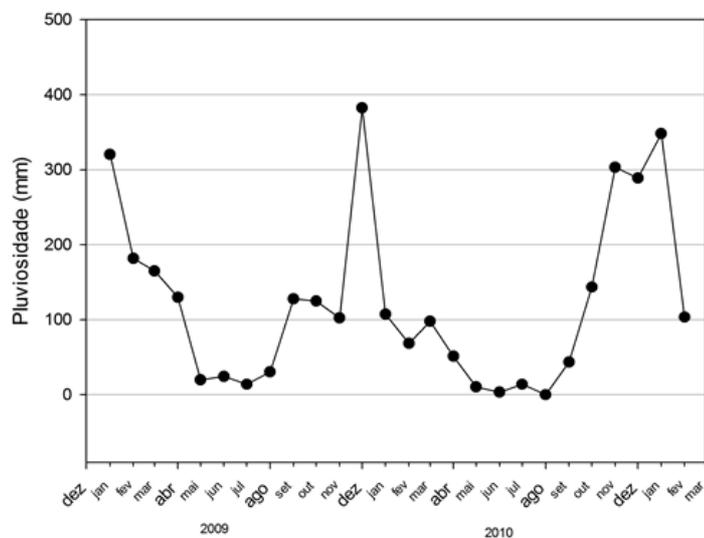


Figura 18 Pluviosidade média anual da área experimental. Estação Climatológica do Departamento de Engenharia da UFLA.

Quanto à produção, para a cultivar Aromas, a testemunha apresentou maior massa total e número de frutos em relação a todos os tratamentos exceto óleo essencial de canela. A massa comercial e o número de frutos comerciais não apresentaram resultados significativos (Tabela 5).

Tabela 5 Variáveis de produção para as cultivares Aromas e Oso Grande submetidas a tratamentos com princípios ativos naturais

Tratamento	Massa Total (g)**	Nº Frutos Total	Massa Comercial (g)	Nº Frutos Comerciais
Aromas				
Testemunha	5891,18 ns	399 a	3123,75 ns	201 ns
Acibenzolar-S-metil	4070,99 ns	285 b	2339,94 ns	153 ns
Própolis	4461,39 ns	310 b	2578,85 ns	165 ns
Menta	4213,01 ns	285 b	2581,72 ns	174 ns
Capim-limão	4052,24 ns	312 b	2480,94 ns	174 ns
Canela	5140,11 ns	365 ab	2807,24 ns	192 ns
Média	4638,15	326	2652,07	176
Oso Grande				
Testemunha	4448,91 ns	288 ab	2866,75 ab	178 ab
Acibenzolar-S-metil	4026,80 ns	251 b	2609,21 ab	163 ab
Própolis	4087,33 ns	285 ab	2390,29 ab	153 ab
Menta	3771,88 ns	240 b	2250,86 ab	142 ab
Capim-limão	3461,26 ns	241 b	1996,69 b	123 b
Canela	4728,15 ns	312 a	3030,87 a	193 a
Média	4087,39	269	2524,11	159

* Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*(média por parcela – 12 plantas)

A produção de frutos de morangueiro é diretamente influenciada pelos tratamentos culturais e condições climáticas (ANTUNES et al., 2007), por esse motivo alterações como a aplicação de produtos, como os aplicados, pode ter influenciado na formação dos frutos, ou por afetar diretamente as flores ou por afugentar os polinizadores. Os polinizadores, no caso de Oso Grande são de grande importância na formação de frutos sem deformação, pois a morfologia de

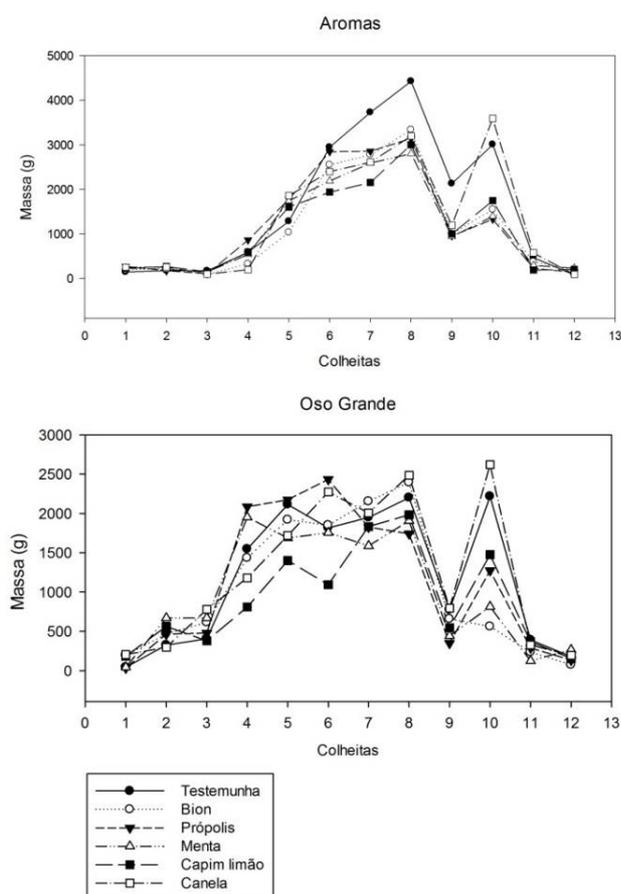
suas flores e o amadurecimento de suas estruturas reprodutivas não favorecem a ocorrência da autopolinização (MALAGODI-BRAGA, 2002).

Para a cultivar Oso Grande a massa total não apresentou diferenças significativas, mas o tratamento com óleo de canela apresentou maior número de frutos, exceto em relação a testemunha. A massa de frutos comerciais e o número de frutos comerciais foram maiores em relação ao capim-limão. Todos os outros tratamentos não diferiram entre si.

Apesar de o morangueiro ser uma planta típica de clima frio, sendo cultivada principalmente em regiões serranas, essa planta pode se adaptar a diversas regiões (FILGUEIRA, 2003). Para a região Sul de Minas Gerais, Oso Grande mostra-se como altamente adaptada. Em trabalho com a mesma cultivar em Bom Repouso – MG, Pereira (2009) obteve maior produção em relação a cultivar Aromas. Contudo, a região experimental citada encontrava-se a 1317 m de altitude, diferença de 399 m em relação a Lavras local da realização do experimento. Para Lavras, nesse teste e no sistema de produção orgânico a cultivar Aromas mostrou-se superior em relação a cultivar Oso Grande.

A sazonalidade de produção (Figura 19) foi diferenciada para as duas cultivares, Oso Grande apesar de produzir menos manteve produção semelhante por mais tempo, reduzindo a produção com o início das chuvas. Aromas apresentou um pico de produção, concentrado no mês de setembro, reduzindo a produção com o início das chuvas como para Oso Grande.

As chuvas na região, iniciadas em outubro prejudicaram as posteriores colheitas, com queda de produção e aumento de frutos danificados. Experimentos anteriores na mesma área com a cultivar Aromas tiveram a mesma redução de produtividade com o início da época chuvosa no mês de outubro. Além da queda de produtividade no fim do período de colheita, os frutos começam a apresentar aumento de podridões, de danos provocados por insetos e desenvolvimento e amadurecimento incompletos (CONTI, 1998).



* Colheitas 1 a 5 realizadas no mês de agosto de 2010, 6 a 9 no mês de setembro e 10 a 12 no mês de outubro de 2010.

Figura 19 Sazonalidade de produção de duas cultivares de morangueiro em Lavras - MG .

Segundo o monitoramento de doenças, as doenças de pós-colheita foram observadas a partir da segunda metade do mês de setembro. A partir desse momento os frutos, após as colheitas foram coletados para a realização das avaliações de doenças em pós-colheita.

A incidência de *B. cinerea* na última avaliação visual foi total, ou seja, atingindo todas as parcelas experimentais, contudo, na data dessa avaliação os frutos já não estavam sendo mais colhidos devido ao reduzido número de frutos e aumento da quantidade de frutos não comerciais.

Em relação às doenças de pós-colheita, considerando a inoculação natural, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, nas duas coletas realizadas, no início e no final do mês de setembro em nenhuma das duas condições de armazenamento.

Apesar de todos os tratamentos apresentarem incidência de podridões notadamente *B. cinerea* e *C. acutatum* não houve diferenças significativas entre os tratamentos. A incidência foi baixa, variando de 0 a 20% nos frutos coletados nas avaliações realizadas.

4.6 Pós-colheita de frutos de morangueiro sob ação de óleos essenciais

Para todas as variáveis analisadas em relação a pós-colheita não houve diferenças, exceto para a cultivar Oso Grande, no parâmetro pH (Tabela 6). Própolis e menta apresentaram valores superiores, menos ácidos, em relação à canela. Os outros tratamentos não diferiram entre si.

Para Aromas os valores variaram de 8,03 a 8,77 em relação aos sólidos solúveis, 3,45 a 3,59 para o pH, 1,14 e 1,43 para ATT e 5,98 a 6,99 para a relação SST/ATT. Para Oso grande os valores variaram de 7,93 a 10,27 em relação aos sólidos solúveis, 3,53 a 3,80 para o pH, 1,02 e 1,19 para ATT e 7,38 a 9,15 para a relação SST/ATT.

Em relação aos sólidos solúveis apesar de não existirem diferenças significativas entre os tratamentos, é considerável a diferença entre os valores para alguns tratamentos, diferente do que ocorreu para Aromas, no qual todos os tratamentos apresentaram valores próximos.

Esses resultados demonstram que a aplicação de óleos essenciais não altera as características químicas dos frutos de morangueiro. Em frutos de morangueiro da cultivar Aromas, Fogolari (2010), assim como no experimento, não obteve alterações quanto as variáveis químicas quando da aplicação de produtos naturais à base de calêndula. Para a mesma cultivar, o autor obteve valores em torno de 6 °Brix inferiores aos aqui obtidos, com AAT semelhante.

Em testes com maracujá, a aplicação de óleo essencial de capim-limão também não promoveu alterações quanto aos sólidos solúveis (ANARUMA et al., 2010). Barrera-Necha et al. (2008) testando os óleos essenciais de canela e cravo em frutos de mamoeiro contra antracnose causada por *C. gloesporioides* não obtiveram diferenças quando aos sólidos solúveis de frutos tratados e não tratados. Para banana, com ação do óleo essencial de canela para o controle de *C. musae* também não houve diferenças entre os sólidos solúveis de frutos tratados e não tratados (MAQBOOL et al., 2010).

Tabela 6 Características químicas analisadas em pós-colheita para as cultivares Aromas e Oso Grande submetidas a tratamentos com óleos essenciais

Tratamento	°Brix	pH	AAT	SST/AAT
Aromas				
Testemunha	8,00	3,50	1,22	6,55
Acibenzolar-S-metil	8,77	3,59	1,28	6,84
Própolis	8,50	3,56	1,36	6,24
Menta	8,47	3,45	1,43	5,98
Capim-limão	8,03	3,57	1,14	6,99
Canela	8,60	3,49	1,29	6,66
Oso Grande				
Testemunha	7,93	3,65 ab*	1,07	7,38
Acibenzolar-S-metil	9,07	3,66 ab	1,06	9,15
Própolis	10,27	3,80 a	1,14	7,99
Menta	9,30	3,71 ab	1,19	8,58
Capim-limão	9,67	3,67 ab	1,13	8,57
Canela	8,53	3,53 b	1,02	8,32

* Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 7 Características químicas analisadas em pós-colheita para as cultivares Aromas e Oso Grande

Tratamento	°Brix	pH	AAT	SST/AAT
Aromas	8,39 a*	3,53 b*	1,29 a	6,54 b
Oso Grande	9,13 a	3,67 a	1,10 b	8,33 a

* Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em comparação entre as cultivares Aromas e Oso Grande (Tabela 7) não diferiram quanto aos Sólidos Solúveis Totais; em relação ao pH, os valores para Aromas foram menores, bem como para AAT e a relação ATT/ SST.

Os valores obtidos de Sólidos Solúveis Totais para as duas cultivares encontra-se na faixa citada por Perkins-Veazie (1995), de 4 a 11 ° Brix variando segundo a cultivar, o clima e o manejo adotado.

Pádua et al. (2006) obtiveram valores menores de sólidos solúveis (8,13) e AAT (0,90) e maiores para pH (3,79) e SST/AAT (9,01) para frutos da cultivar Oso Grande oriundos de Bom Repouso – MG. Pallamin (2007) também obteve menores valores para todas as variáveis para frutos de morangueiro da mesma cultivar, na região de Bauru – SP em altitudes em torno de 620 m. Mangnabosco et al. (2008) encontraram valores médios de 6,0 para °Brix, também inferiores aos obtidos para cultivar Aromas neste experimento.

4.7 Óleos essenciais no controle de patógenos do morangueiro em pós-colheita

Quanto aos tratamentos por volatilização, todos os tratamentos, canela, capim-limão, menta e eucalipto não apresentaram diferenças significativas em relação à incidência de mofo cinzento e de outras podridões. Silva (2008) demonstrou que os óleos essenciais de alho, canela, erva-doce, menta e orégano não se mostraram eficientes por vaporização em frutos de morangueiro oriundo de sistema de cultivo orgânico, em frutos de sistema convencional os óleos de alho, canela, erva-doce, menta e orégano mostraram algum efeito na redução de

podridões. O sistema de cultivo pode ter influenciado visto que os frutos eram oriundos de área orgânica.

Para os tratamentos por imersão (Figura 20) a incidência de mofo cinzento foi menor no tratamento realizado com óleo de eucalipto. Os maiores valores foram observados para o óleo essencial de capim-limão, que modificou também a coloração dos frutos, amarelando-os anormalmente e facilitando a infecção pelo patógeno. Todos os outros tratamentos não diferiram entre si. Quanto às podridões em geral não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Para frutos de maracujazeiro, Anaruma et al. (2010) também observaram alterações nos frutos principalmente em concentrações superiores a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ com aumento da severidade da antracnose do maracujazeiro. Em frutos de bananeira, altas concentrações de óleo de canela promoveram danos durante períodos de armazenamento (MAQBOOL et al., 2010). Frutos de mamoeiro submetidos ao tratamento por imersão com óleos de canela e de cravo obtiveram redução no percentual de infecção por *C. gloesporioides* sem relatos de alterações nos frutos (BARRERA-NECHA et al., 2008).

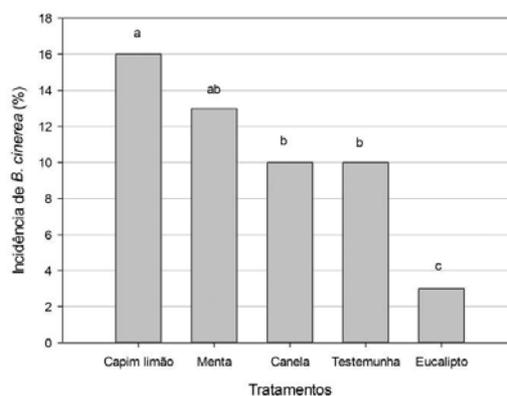


Figura 20 Incidência de mofo cinzento em frutos de morangueiros tratados por imersão com óleos essenciais.

Os frutos recobertos por fécula de mandioca não apresentaram diferença entre eles. Observou-se o recobrimento total de toda a superfície do morango, comprovado pelo teste com a utilização do amido.

Campos (2008) trabalhando com o recobrimento de morangos orgânicos com fécula de mandioca e fécula mais aditivos observou que o tratamento apenas com a fécula não teve resultados na redução de podridões tal qual foi avaliado no experimento realizado. Rozwalka (2009) trabalhando com goiabas recobertas por fécula a 2% acrescidas de óleos essenciais de cravo, canela, palmarosa, capim-limão e tomilho, na concentração de 0,1%, obteve redução da antracnose causada por *C. gloesporioides*. O uso do recobrimento com fécula, no caso do morango, que é consumido diretamente e altamente perecível ainda necessita de mais pesquisas, não se mostrando eficiente na redução de podridões.

Contudo, a utilização do recobrimento com quitosana e o tratamento em pré-colheita com cálcio mostrou-se eficiente na redução de podridões em frutos de morangueiro (HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2008).

Em todos os tratamento as podridões predominantes foram causadas por *Rhizopus* sp. Essas podridões decorrem-se da pré-colheita. Estruturas fúngicas permanecem na superfície dos frutos e a infecção ocorre após a colheita com alto potencial para disseminação por contato de frutos contaminados com frutos sadios nas próprias embalagens (DIAS et al., 2005).

5 CONCLUSÕES

1 - Óleos essenciais são eficientes no controle biológico de doenças, mofo cinzento e antracnose, em morangueiro em condições *in vitro*.

2 - *Trichoderma* spp. apresenta potencial como antagonista para mofo cinzento e antracnose do morangueiro.

3 - Óleos essenciais de capim-limão e canela são estratégias para o manejo de isolados resistentes de mofo cinzento.

4 – Variáveis relacionadas às características químicas de pós-colheita não são alteradas pelo uso de óleos essenciais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de doenças na cultura do morangueiro é fator limitante para a produção. Além disso, esbarra na falta de produtos registrados e na questão de contaminação ambiental e mesmo do próprio homem. A agricultura orgânica emergente pelo mercado mais exigente de produtos com menos resíduos também é limitada pela falta de produtos que possam auxiliar no manejo da cultura.

Os tratamentos alternativos, baseados no controle biológico, vêm mostrando resultados promissores em várias áreas. Para o morangueiro, em condições *in vitro* óleos essenciais mostraram-se eficientes e controlaram tanto a antracnose quanto o mofo cinzento, o que foi evidenciado por vários experimentos. Antagonistas como o fungo *Trichoderma*, além do consagrado *Clonostachys rosea*, apresenta-se como outra alternativa para o controle de doenças nesse patossistema.

O cultivo orgânico demonstrou viabilidade na produção de frutos de qualidade, com baixa incidência de doenças apesar de condições favoráveis. Óleos essenciais aplicados em frutos de morangueiro em condições de campo não alteram características organolépticas, possibilitando seu uso como produtos fitossanitários. São necessários mais estudos para a determinação de uma metodologia de aplicação de óleos essenciais no combate de podridões em morangueiro tanto em pré quanto em pós-colheita.

Métodos de dispensação de óleos essenciais em frutos de morangueiro em condições de pós-colheita são focos de estudo. Há dificuldades quanto à adaptação de metodologias para morangueiro, devido às características do próprio fruto. Estudos são necessários com a finalidade de se viabilizar o uso de óleos essenciais em condições de pós-colheita.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**, 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) - UNESP – FCA Faculdade Ciências Agronômicas, Botucatu, 2006.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. London, UK: Elviesier Academic Press. 2005. 530 p.

AGROFIT - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2011 Disponível em: < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 28 ago. 2011.

ALFENAS, A. C.; SANFUENTES, E.; TEIXERA, A. D.; MILANI, D. Mofocinzeno, causado por *Botrytis cinerea* (Persoon ex Fries) em estacas e microestacas de *Eucalyptus* sp., resistência a benomil e erradicação de inóculo do patógeno com água quente. **Revista Árvore**, Viçosa. v. 4, n.23, p. 497-500, 1999.

ANARUMA, N. D., SCHMIDT, F. L., DUARTE, M. C. T., FIGUEIRA, G. M., DELARMELINA, C., BENATO, E. A., SARTORATTO, A. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal Microbiology** v.41, p. 66-73, 2010.

ANTUNES, L. E. C. Panorama da produção de morango no Brasil. **Revista Campo & Negócios HF**. Uberlândia, Ano VII v. 69, n.91 p, 2010a.

ANTUNES, L. E. C.; RISTOW, N. C.; KROLOW, A. C. R.; CAPENEDO, S.; REISSER JÚNIOR, R. N. C. Yield and quality of strawberry cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 222-226, 2010b.

ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J.; CALEGARIO, F. F.; COSTA, H.; REISSER JUNIOR, C. Produção integrada de morango (PIMo) no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 34-39, 2007.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C. Fragole, i produttori brasiliani mirano all'esportazione in Europa. **Frutticoltura**, Bologna, v. 69, n.1, p. 60-65, 2007.

ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J. **Sistema de produção do morango**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/index.htm>>. Acesso em: 25 ago. 2009.

AGRIANUAL - ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: Agra FNP Pesquisas Ltda, 2008. 502 p.

AGRIANUAL - ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: Agra FNP Pesquisas Ltda, 2009. 497 p.

ASSIS, M. **Produção de mudas e matrizes de morangueiro no Brasil**. In: Simpósio Nacional do Morango. Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas, Pelotas, **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004, p. 46-51.

AZIZI, M.; FARZAD, S.; JAFARPOUR, B.; RASTEGAR, M. F.; JAHANBAKHS, V. Inhibitory effect of some medicinal plants' essential oils on postharvest fungal disease of citrus fruits. In: **International Horticultural Congress**, 27., 2006, Belgium. **Anais...** Belgium: Acta Horticulturae, 2008. p. 279-286.

BAKER, R.; COOK, J. **Biological control of plant pathogens**, San Francisco. W. H. Freeman, 1974

BARRERA-NECHA, L. L.; BAUTISTA-BANOS, S.; FLORES-MOCTEZUMA, H. E.; ESTUDILLO, A. R. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Pathology**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 174-178, 2008.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; GARCÍA, E.; BARRERA, L.; REYES, N.; WILSON, C. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.29, p.81-92, 2003.

BELL, D. K.; WELLS, H. D., MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (eds.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna; Embrapa Meio Ambiente, 2003. p.79-96.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-728.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P.. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia agricola**, v.55, p.149-152, 1998.

BOFF, P. **Agropecuária saudável: da prevenção de doenças, pragas e parasitas à terapêutica não residual**. Lages: Epagri/ Udesc, 2008. 80p.

BOFF, P. **Epidemiology and biological control of grey mould in annual strawberry crops**. 128p. Tese University Wageningen, Wageningen, 2001.

BONFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N.O. Avaliação antagonista in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.61-67, 2010.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.128-134, 2004.

BORTOLOZZO, A. R.; SANHUEZA, R. M. V.; MELO, G. W. B.; BERNARDI, A. K. J.; HOFFMANN, A.; BOTTON, M.; FREIRE, J. M.; BRAGHINI, L. C.; VARGAS, L.; CALEGARIO, F. F.; FERLA, N. J.; PINEN, S. M. J. Produção de morangos no sistema semi-hidropônico. **Circular Técnica**, Embrapa, Uva e Vinho, Bento Gonçalves, n. 62, 2007.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 007** de 17 de maio de 1999. Estabelece normas para a produção orgânica vegetal e animal. Diário Oficial da União. Brasília, n. 94, 19 de maio de 1999.

BRAUN, P. G.; SUTTON, J. C. Inoculum sources of *Botrytis cinerea* in fruit rot of strawberries in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 9, p.1-5, 1987.

BRAUN, P. G.; SUTTON, J. C. Infection cycles and population dynamics of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.10, p. 133-141, 1988.

BUENO, S. C. S.; MAIA, A. H. N.; TESSARIOLI NETO, J. Florescimento de 17 cultivares de morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch.), em São Bento do Sapucaí–São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17. **Anais...** Belém: SBF.(CD-ROM), 2002.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review **International Journal of Food Microbiology** v.94, p. 223 – 253, 2004.

CAMPBELL, R. **Biological Control of microbial plant pathogens**. Cambridge University Press, Cambridge, 1989, 219p.

CAMPOS, R. P. **Revestimentos biodegradáveis na conservação de morango orgânico ‘camarosa’ refrigerado** 104p. Tese (Doutorado em Agronomia) UEM, 2008.

CAMPOROTA, P. Antagonism in vitro of *Trichoderma* spp. vis-a-vis *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Agronomie**, v.5. p.613-620,1985.

CARVALHO, S. P. Histórico, importância socioeconômica e zoneamento da produção no Estado de Minas Gerais. In: CARVALHO, S. P (Coord.). **Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar e cultivo orgânico**. Belo Horizonte: FAEMG, 2006, p. 9-14.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. Guaíba: Agropecuária, 1995, 196p.

CHANG, H. T.; CHENG, Y. H.; WU, C. L.; CHANG, S. T.; CHANG, T. T.; SU, Y. C. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi **Bioresource Technology** v.99, p. 6266–6270, 2008.

CLAYDON, N., ALLAN, M. L., HANSON, J. R., AVENT, G. A. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society** n. 4, v.88, pp. 503-513, 1987.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v.33, p. 344-9, 2011.

CONTI, J. H. **Estudo de caracteres morfológicos, agronômicos e moleculares em cultivares de morango (Fragaria X ananassa Duch.)**. 154 p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

COSTA, H.; ZAMBONI, L.; VENTURA, J. A. Manejo Integrado das Doenças do Morangueiro. In: ZAMBONI, L. (Ed.). **Produção Integrada Fruteiras Tropicais**, Viçosa, 2003, p.131-164.

COTA, L. V.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; MACEDO, P. E. F. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. **Biological Control**, v. 50, p. 222-230, 2009.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981, 210 p.

DAVID, E. F. S. **Desenvolvimento, trocas gasosas, rendimento e composição de óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com variação dos níveis de N, P, K e Mg**. Tese (Doutorado em Horticultura) - UNESP – FCA Faculdade Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007, 132 p.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. 4022–4034, 2009.

DHINGRA, O. D. Patologia pós-colheita. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 46-50, fev. 1985.

DIAS, M. S. C., CANUTO, R. S., SANTOS, L. O., MARTINS, R. N. Doenças do morango. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, p. 40-43, 2005.

DIAS, M. S. C.; COSTA, H.; CANUTO, R. S. Manejo de doenças do morangueiro In: **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, p.64-77, 2007.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERREIRA, L. R.; ARIEIRA, J. O.; MIGUEL, E. G.; DONEGA, M. A.; RIBEIRO, R. C. F. *Eucalyptus citriodora* and *Azadirachta indica* oil activity in the control of *Colletotrichum acutatum*, in strawberry crop. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.228-232, 2010.

DUARTE FILHO, J. Cultivares de morango. In: CARVALHO, S.P. (Coord.). **Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar e cultivo orgânico**. Belo Horizonte: FAEMG, 2006, p.15-22.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro **Ciência Rural**. v.31, p. 885-887, 2001.

FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. **Fruticultura: fundamentos e práticas**. Pelotas: Editora UFPel, 2008, 311p.

FAO. Dados agrícolas de FAOSTAT, Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 25 nov 2011.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2^o ed. Viçosa, 2003, 412p.

FIORI, A. C. G.; SCHAWN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Dydimella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.148, p.483-487, 2000.

FOGOLARI, H. **Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução de resistência e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea* in vitro**, 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2010.

GALLETTA, G. J.; BRINGHURST, R.S. Strawberry management. In: GALLETTA, G. J., HIMELRICK, D. G. (Ed.). **Small fruit crop management**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990, p.83-156.

GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; AQUIJE, G. M. F. V.; FERNANDES, A. R.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives **Brazilian Journal of Microbiology** v.39, p.163-168, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, 2007 .

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.4, p.137- 144, 2003.

GÓRSKI, R.; SOBIERALSKI, K.; SIWULSKI, M.; GÓRA, K. Effect of selected natural essential oils on in vitro development of fungus *Trichoderma harzianum* found in common mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation **Ecological Chemistry and Engineerings**, Warsaw, n.2, v.17, 2010.

GUNNELL, P. S.; GUBLER, W. D. Taxonomy and morphology of Colletotrichum species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, v.84, p.157-165, 1992

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p.387-412, 1996.

HAMMERSHIMIDT , R.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Dublin, v.107, p.1-6, 2001.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary**, 2^a ed., 1999, p.605-611.

HELBIG, J. Biological Control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in Strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.149, p.265-273, 2001.

HERNANDEZ-MUNOZ, P.; ALMENAR, E.; DEL VALLE, V.; VELEZ, D.;

GALVARA, R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium

treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage **Food Chemistry** v.110, p. 428–435, 2008.

HOWARD, C. M.; MAAS, J. L.; CHANDLER, C. K.; ALBREGTS, E. E. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. **Plant Disease** v.76, p.976-981. 1992.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. 4ª ed, Brasília, D.F.: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância, 2005.

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

JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**. v. 40, p.411-444, 2002.

JORDAN, V. W. L.; RICHMOND, D. V. The effects of benomyl on sensitive and tolerant isolates of *Botrytis cinerea* infecting strawberries. **Plant Pathology**, v.23, p.81-83, 1974.

KADOGLIDOU, K.; LAGOPODI, A.; KARAMANOLI, K.; VOKOU, D.; BARDAS, G. A.; MENEXES, G.; CONSTANTINIDOU, H. I. A. Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum* and *Verticillium dahliae* **European Journal of Plant Pathology**, n.3, v. 130, p. 297-309, 2011.

KEEN, N.T.; YOSHIKAWA, M.; WANG, M.C. Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f.sp. *Glycinea* and other sources. **Plant Physiology**, Waterbury, n.3, v.71, p.466-471, 1983.

KISHORE, G. K.; PANDE, S.; HARISH, S. Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. **Plant Disease**, Davis, n.4, v.91, p.375-379, 2007.

LAI, F.; WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H.; FADDA, A. M. *Artemisia arborescens* L. essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization **AAPS Pharm Sci Tech**, v.7, n.1, p.E1-9, 2006.

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

LEGARD, D.E.; MACKENZIE, S. J.; MERTELY, J.C.; CHANDLER, C.K.; PERES, N.A. Development of a reduced use fungicide program for control of *Botrytis* fruit rot on annual winter strawberry. **Plant Disease** v. 89, 1353-1358, 2005.

LICHTFOUSE, E. Sustainable agriculture as a central science to solve global society issues. In: Lichtfouse E (ed) Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants. **Sustainable Agriculture Reviews** v., 1, p. 1-3, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, Plantarum, 2008, 544p.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microorganismos no Brasil. In: MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. (eds) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, p. 15-28.

LOUZADA, G. A. S., CARVALHO, D. D. C., MELLO, S. C. M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica** n.3, v.9, p. 143-49, 2009.

LUENGO, R. C. A.; PARMAGNANI, R. M.; PARENTE, M. R.; LIMA, M.F.B.F. Tabelas de composição nutricional das hortaliças. Brasília (DF): EMBRAPA, 2000.

MAAS, J. L. (Ed.) **Compendium of strawberry diseases**. 2^a ed., St. Paul: The American Phytopathological Society, 1998, 98p.

MACEDO, M. A., MARTINS, I., DELGADO, G. V., MELLO, S. C. M., MENÊZES, J. E. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de

Sclerotium rolfsii / **Boletim de pesquisa e desenvolvimento** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 11 p.

MACHADO, M. A. C. F.; BETTIOL, W. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, 2010 .

MALAGODI-BRAGA, K.S. **Estudo de agentes polinizadores em cultura de morango (*Fragaria x ananassa* Duchesne – Rosaceae)**. 102f. Tese (Ph.D.) – Instituto de Biociências, 2002, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MANGNABOSCO, M. C.; GODOY, W. I.; MAZZARO, S.; CITADIN, I.; FARINACIO, D.; BORSATTI, F. Avaliação das características químicas de seis cultivares de morangueiro na região sudoeste do Paraná. **Horticultura Brasileira**, v.26, S5456-S5461, 2008.

MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; BORGES, N. S. S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Campinas. v.25, p.429-432, 2007.

MAAS, J. L. **Compendium of strawberry diseases**. 2 ed. APS Press, St Paul. 98 p.

MAQBOOL, M.; ALI, A.; ALDERSON, P. G. Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage **International Journal of Agriculture & Biology** v.12, p.516–520, 2010.

MATTOS, M. L. T. Segurança Alimentar: o caso do morango. In: 2º Simpósio Nacional do Morango – 1º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. **Documentos** 124, p.162-169, 2004.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; MAGNO JUNIOR, R. G.; LOPES, E. A. G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. e P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, p.83-90, 2007.

MELO, I. S.; COSTA, C. P. Controle biológico da murcha de berinjela causada por *Verticillium albo-atrum*. **An. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz**. v.44, n.2, pp. 1353-1364, 1987.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.

MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose de sorgo em condições de laboratório. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 19, n. 1, p. 14-17, 1993.

MORAES, W. B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.27, p.175-190, 1992.

MORANDI, M. A. B.; MATTOS, L. P. V.; SANTOS, E.R.; BONUGLI, R. C. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. **Crop Protection**, v.27, p.77-83, 2007.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de plantas no Brasil In: MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. (eds) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, 314p.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control** v. 13, p.289 – 292, 2003.

MYRESIOTIS, C.K.; KARAOGLANIDIS, G.S.; TZAVELLA-KLONARI, K. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, v.91, n.4, p. 407–13, 2007.

NERI, F.; MARI, M.; BRIGATI, S. Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds **Plant Pathology**, v.55, n.1, pp. 100–105, 2006.

NGUEFACK, J.; LETHA, V.; AMVAM ZOLLOB, P. H.; MATHUR, S.B.. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.329-334, 2004.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, 2003, 188p.

OLIVEIRA, T. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. **Avaliação da atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* sp. para biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos

e Biotecnologia, 2008. 7p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 177)

PÁDUA, J. G.; MOTA, R. V. da; DUARTE FILHO, J.; CAPRONI, C.M., GONÇALVES, F.M. . Características físico-química de frutos de cultivares de morangueiro. In: **III Simpósio Nacional do Morango e II Encontro sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul**, 2006, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006.

PAL, K. K.; GARDENER, B. M. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor, Apsnet, DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02, 2006.

PALLAMIN, M. L. **Alternativas no controle fitossanitário em diferentes cultivares de morangueiro como ferramenta na produção integrada**. 60f. Dissertação (Mestrado em Horticultura) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2007

PAPAVIZAS, G. G. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**. V.23, p.23 – 54, 1985.

PENGELLY, A. **The constituents of medicinal plants** 2^a ed., CABI: Washington, 2004, 172p.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun, 2008a.

PEREIRA, C. S. ; GUIMARÃES, R. J. ; POZZA, E. A. ; SILVA, A. A. Controle da cercosporiose e da ferrugem do caféiro com extrato etanólico de própolis. **Revista Ceres**, v. 55, p. 369-376, 2008b.

PEREIRA, W. R. **Produtividade e qualidade de frutos de cultivares de morangueiro, em diferentes épocas de plantio**. 59p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PERKINS-VEAZIE, P. Growth and ripening of strawberry fruit. **Horticultural Reviews**, West Port, Connecticut-AVI, 1995, v.17, p.267-297, 1995.

PILLMOOR, J. B.; WRIGHT, K., TERRY, A. S. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. **Pesticide Science**. v. 39, p.131-140, 1993.

PINTO, C. M. F.; MAFFIA, L. A.; CASALI, V. W. D.; CARDOSO, A. A. In Vitro Effect of Plant Leaf Extracts on Mycelial Growth and Sclerotial Germination of *Sclerotium cepivorum*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 46, p. 421 – 425, 2008.

PLAKIDAS, A. G. Fruit rot. In: Plakidas, A.G.(ed.) **Strawberry Diseases**. Louisiana State University Press, Baton Rouge, United States of America, 1964, p. 73-88.

PLOTTO, A.; ROBERTS, D.D.; ROBERTS, R.G. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Acta Horticulturae**, v. 628, p. 737-45, 200.

PURKAYASTHA, R.P. **Progress in phytoalexin research during the past 50 years**. In: DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. Handbook of phytoalexin metabolism and action. Marcel Dekker: New York, 1995, 615p.

R. DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2012, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

RANASINGHE, B.; JAYAWARDENA, K.; ABEYWICKRAMA Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merret L. M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 208–211, 2002.

ROSSLENBROICH, H. J.; STUEBLER, D. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. **Crop Protection** v. 19, p. 557-561, 2000.

ROZWALKA, L. C. **Óleos essenciais: ação sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, associados ou não à película de fécula de mandioca no controle da antracnose em goiaba**. 2010, 198f. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v.100 p. 923-935, 1996.

SANTOS, L. O.; MARTINS, R. N.; DURIGAN, J. F.; MATTIUZ, B. H. Técnicas de conservação pós-colheita do morango **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 88-97, 2007.

SANTOS, M. D.; SILVA, G. B.; LUSTOSA, D. C. Avaliação *in vitro* *Trichoderma* spp. a diferentes isolados fúngicos da região Amazônica. VI Seminário de Iniciação Científica da UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA. **Anais...** Belém, 2008.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide. version 6.12. Cary, 1998. 842 p.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 125-133.

SEGHESE, M. A. **Projeto Vida no Campo** Vale do Ribeira – Sete Barras: São Paulo, 2006, 206p.

SILVA, A. F.; DIAS, M. S. C.; MARO, L. A. C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte: EPAMIG, v. 28, n. 236, p. 7-13, jan./fev. 2007a.

SILVA, J. C. M.; COELHO, L. Resistência a fungicidas de *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries, fungo causador de tombamento em mudas de *Eucalyptus* sp. em viveiros florestais **Ciência Florestal**, v. 13, n. 02, pp. 27-36, 2003.

SILVA, R. F., PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p.189-196, 2007b.

SILVA, F. C. 2008 **Efeito in vitro e in vivo dos óleos essenciais de condimentos sobre fungos que ocorrem em pós-colheita em frutos de morango e mamão** 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras – Lavras.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.;

PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. p. 394-412.

SIMON, N.; MENEGUZZO, A.; CALGARO, A. Doenças causadas por fungos e bactérias In: SANHUEZA, R.M.V.; HOFFMANN, H.; ANTUNES, L.E.C.; FREIRE, J. M. **Sistema de produção de morango para mesa na região da serra gaúcha e encosta superior do Nordeste**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. (Sistema de Produção, 6). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/inedex.htm>>. Acesso em: 05 de setembro de 2009.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. L. **Manual de horticultura orgânica**. 2. ed., atual. ampl. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2006. 843 p.

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*, **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 183-9, 2010.

SUTTON, J. C., PENG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology** 83, 615-621, 1993.

STANGARLIN, J. R. Uso de extratos e óleos essenciais no controle de doenças de plantas - **Fitopatologia Brasileira**, Maringá, v. 32 suplemento, ago 2007, p. s94- s96.

TANAKA, M. A. S.; BETTI, J. A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 489-499.

TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 27 n. 5., p. 484-488, 2002.

TZORTZAKIS, N. G., ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovation Food Science Emergence Technology**, v. 8, p. 253-258, 2007.

UENO, B. Manejo Integrado de Doenças do Morango. In: In: Simpósio Nacional do Morango, 2.; Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas, 1., 2004, Pelotas, **Anais...** Pelotas: EMBRAPA, 2004, p. 70-6.

VAN KAN, J. A. L. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends Plant Science**, v.11, p. 247–253, 2006.

WASHINGTON, W. S.; SHANMUGANATHAN, N.; FORBES, C.; Fungicide control of strawberry fruit rots, and the field occurrence of resistance of *Botrytis cinerea* to Iprodione, Benomyl, and Dichlofluanid. **Crop Protection**, v.11, p. 355-360, 1992.

WEBER, R. W. S Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in northern German small-fruit production , **Plant Disease**, v. 95, n. 10, pp.1263 – 9, 2011.

WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v.24, p.1153-1179, 1934.

WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., TUDZYNSKI, P., VAN KAN, J. A. L., *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology** v.8, 561–580, 2007.

WILSON, L. L.; MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A. Comparison of conidial germination and strawberry fruit infection by three *Colletotrichum* species. **Phytopathology**, v. 83, p.1390, 1993.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL GHAOUTH, A.; WISNIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils of antifungal activity against *Botrytis cinerea* **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n.2, p. 204-210, 1997.