



**TAMARA LEITE DOS SANTOS**

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE  
*Lecanicillium fungicola* E SUA COLONIZAÇÃO  
EM *Agaricus bisporus***

**LAVRAS – MG**

**2015**

**TAMARA LEITE DOS SANTOS**

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Lecanicillium fungicola*  
E SUA COLONIZAÇÃO EM *Agaricus bisporus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Eduardo Alves

Coorientador

Dr. Eustáquio Souza Dias

**LAVRAS – MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Santos, Tamara Leite dos.

Efeito de óleos essenciais sobre *Lecanicillium fungicola* e sua  
colonização em *Agaricus bisporus* / Tamara Leite dos Santos. –  
Lavras : UFLA, 2015.

79 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador(a): Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. *Lecanicillium fungicola*. 3. MEV. 4.  
Controle alternativo. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

**TAMARA LEITE DOS SANTOS**

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Lecanicillium fungicola*  
E SUA COLONIZAÇÃO EM *Agaricus bisporus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de Fevereiro de 2015.

Dr. Diego Cunha Zied                          UNESP

Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Gontijo Labory      UFLA

Dr. Eduardo Alves  
Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

Aos meus pais, João e Irani, pelo apoio constante em todos os momentos da  
minha vida.

Ao meu irmão Renan, pelo carinho e companheirismo.

Ao meu noivo Jorge, pelo apoio, amor, paciência e confiança.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me permitiu a realização deste ideal.

A toda a minha família, por permanecer sempre ao meu lado durante esta jornada. Minha eterna gratidão!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Fapemig, pelo apoio financeiro na manutenção de equipamentos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da UFLA e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Eduardo Alves pela orientação, paciência, confiança e aos ensinamentos compartilhados durante a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Eustáquio Souza Dias pela disponibilidade e orientação.

Ao professor Dr. Diego Cunha Zied e à Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Gontijo Labory pela gentileza em aceitarem o convite para participar da banca examinadora.

Aos professores Dr. Whasley Ferreira Duarte e Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Cardoso, pelas contribuições e sugestões na etapa da qualificação.

Às laboratoristas Elisa e Aline, pela atenção, dedicação e amizade durante esta caminhada.

A todos os meus colegas do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e do LME por toda ajuda, troca de experiência e pela convivência harmoniosa.

À secretária Rose, pela paciência e prestatividade.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

## RESUMO

No Brasil, vem se notando um crescimento no consumo e, conseqüentemente, na produção e comercialização de cogumelos, em especial *Agaricus bisporus*, o champignon. Esse fato ocorre por haver, atualmente, maior divulgação de seu valor nutritivo e medicinal e por seu preço ter se tornado um pouco mais acessível à população. Entretanto, a espécie *Lecanicillium fungicola* é ainda hoje considerada como o patógeno mais importante de *A. Bisporus*, desenvolvendo-se onde quer que se cultive o cogumelo. Além disso, sabe-se que a sensibilidade do patógeno vem diminuindo frente aos fungicidas atualmente utilizados no controle deste. Desta forma, este estudo objetivou avaliar o efeito de óleos essenciais extraídos de *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Origanum vulgare* (orégano), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) sobre o crescimento micelial e a germinação de conídios de *L. fungicola in vitro*; além de verificar a interação entre *A. bisporus* e *L. fungicola* por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os óleos de canela e cravo na concentração 0,4% e tomilho a 0,8% inibiram o crescimento micelial do fungo, enquanto os óleos de orégano, erva-cidreira e eucalipto não foram eficientes. A germinação de conídios foi inibida pelo óleo de canela em todas as concentrações, o óleo de cravo a 0,4% e o óleo de tomilho a 0,8%, ao passo que, os óleos de eucalipto, erva-cidreira e orégano não foram eficientes novamente. O exame de microscopia eletrônica de varredura revelou que após 19 horas da inoculação de *L. fungicola* em *A. bisporus*, os esporos já estão completamente germinados, o que indica a ocorrência da infecção. Assim, os resultados deste trabalho sugerem que os óleos de *S. aromaticum*, *C. zeylanicum* e *T. vulgaris* são alternativas potenciais para o tratamento de cogumelos no controle de *L. fungicola*.

Palavras-chave: Óleos essenciais. *Lecanicillium fungicola*. MEV. Controle alternativo.

## ABSTRACT

In Brazil, we notice a rise in consumption and, consequently, in the production and commercialization of mushrooms, especially *Agaricus bisporus*, the popular champignon. This occurs because of the current major promotion of its nutritional and medicinal properties and for its price having become more accessible. However, the *Lecanicillium fungicola* species is considered the main pathogen for *A. bisporus*, growing wherever the mushroom establishes. In addition, it is known that the pathogen's sensibility decreases because of the fungicides currently used for its control. Therefore, this study aimed at evaluating the effect of essential oils extracted from *Melissa officinalis* (lemon balm), *Thymus vulgaris* (thyme), *Origanum vulgare* (oregano), *Eucalyptus globulus* (eucalyptus), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) and *Syzygium aromaticum* (India clove) over the *in vitro* mycelial growth and conidia germination of *L. fungicola*; as well as verifying the interaction between *A. bisporus* and *L. fungicola* by means of scanning electron microscopy (SEM). The cinnamon and India clove oils, in the concentration of 0.4%, and thyme, at 0.8%, inhibited the mycelial growth of the fungus, while oregano, lemon balm and eucalyptus oils were inefficient. The Scan Electron Microscopy revealed that, after 19 hours of *L. fungicola* inoculation to *A. bisporus*, the spores were already fully germinated, which indicates the occurrence of infection. Thus, the results of this study suggest that *S. aromaticum*, *C. zeylanicum* and *T. vulgaris* oils are potential alternatives in treating mushrooms for controlling *L. fungicola*.

Keywords: Essential oils. *Lecanicillium fungicola*. SEM. Alternative control.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
2.1	Cultivo de cogumelos .....	12
2.2	<i>Agaricus bisporus</i> .....	15
2.3	<i>Lecanicillium fungicola</i> .....	17
2.4	Óleos essenciais .....	20
2.4.1	Biossíntese de terpenóides .....	22
2.4.2	Biossíntese de fenilpropanóides .....	24
2.4.3	Atividade biológica dos óleos essenciais .....	26
2.5	Uso da microscopia eletrônica no estudo da interação fungo-cogumelo .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1	Local do estudo .....	29
3.2	Obtenção dos isolados de <i>Lecanicillium fungicola</i> .....	29
3.3	Material vegetal .....	29
3.4	Extração .....	30
3.5	Avaliação das concentrações de cada óleo essencial por meio do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) .....	31
3.6	Avaliação da germinação de conídios submetidos à exposição direta de óleos essenciais em diferentes concentrações .....	34
3.7	Estudo da interação entre o patógeno <i>L. fungicola</i> e o hospedeiro <i>A. bisporus</i> por microscopia eletrônica de varredura .....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
4.1	Avaliação das concentrações de cada óleo essencial por meio do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) .....	40
4.2	Avaliação da germinação de conídios submetidos à exposição direta de óleos essenciais em diferentes concentrações .....	46
4.3	Estudo da interação entre o patógeno <i>L. fungicola</i> e o hospedeiro <i>A. bisporus</i> por microscopia eletrônica de varredura .....	55
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
	<b>ANEXOS</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis, apreciados em muitas dietas europeias e orientais, vêm sendo largamente pesquisados nos últimos anos, já que o seu cultivo possibilita reciclar economicamente certos resíduos agrícolas e agroindustriais.

Sob o ponto de vista nutricional, considerando o elevado conteúdo protéico dos cogumelos comestíveis, seu cultivo tem sido apontado como uma alternativa para incrementar a oferta de proteínas às populações de países em desenvolvimento e com alto índice de desnutrição. Além desses aspectos, a importância dos cogumelos está ligada ao mercado em contínuo crescimento, aos avanços tecnológicos para melhorar a qualidade, produtividade e o custo de produção, ao ainda baixo consumo “per capita”, mesmo nos países mais desenvolvidos e, às ilimitadas opções de espécies que podem ser cultivadas.

As propriedades medicinais de alguns cogumelos vêm incrementando o seu valor agregado e, sob o ponto de vista empresarial, considera-se que o cultivo de cogumelos exige tecnologia e, portanto, constitui-se em atividade diferenciada e seletiva do ponto de vista técnico-econômico, pois, a diminuição dos custos de produção, pode representar um grande trunfo para o sucesso do empreendimento.

O cogumelo mais cultivado no Brasil e no mundo é o champignon (*Agaricus bisporus*). Entretanto, sua produção é afetada por uma grande variedade de pragas e patógenos. Um grande e persistente problema na indústria de cogumelos é o *Lecanicillium fungicola*, o agente causal da doença bolha seca. Os sintomas causados por este patógeno vão a partir de pequenas lesões necróticas até massas amorfas no tecido do cogumelo. Entretanto, as informações sobre a sua interação parasita são limitadas.

O controle de *L. fungicola* depende estritamente de saneamento e do uso de fungicidas. Os poucos fungicidas que têm sido utilizados, ou não estão disponíveis, ou estão cada vez mais a tornarem-se ineficazes devido ao desenvolvimento de resistência a fungicidas pelo agente patogênico. Portanto, são necessárias novas formas de combater a doença bolha seca.

Neste contexto, a atual tendência adotada pelos órgãos legisladores de produção de alimentos e consumidores tem exigido uma progressiva retirada de fungicidas dos alimentos. Essa tendência tem conduzido os produtores e as indústrias alimentícias a buscarem compostos que lhes permitam alcançar suas metas relacionadas à estabilidade microbiana dos seus produtos em relação à ação de microrganismos deteriorantes e ou patogênicos. Essa busca impulsiona também a preocupante realidade com o progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes a fungicidas. Dessa forma, os óleos essenciais são uma alternativa aos fungicidas, atuando no controle microbiológico, visando à obtenção de alimentos naturais.

Pesquisas evidenciam a potencialidade dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos, sendo muitos deles extraídos de condimentos ou especiarias que são habitualmente utilizados na preparação de alimentos, não apresentando toxicidade ao homem nas concentrações utilizadas. Dessa forma, tornam-se viáveis estudos que evidenciem o uso de produtos naturais como agentes antissépticos na prevenção de doenças.

Além disso, o conhecimento sobre a ação dos óleos essenciais no controle da doença pode contribuir para o desenvolvimento de produtos promissores, os quais futuramente reduzirão os custos de produção e estimularão o consumo.

Diante do exposto, objetivou-se neste estudo analisar o potencial *in vitro* de 6 óleos essenciais, em diferentes concentrações, no crescimento micelial e na

germinação de conídios, sobre os isolados de *L. fungicola*, e verificar a interação entre *A. bisporus* e *L. fungicola* por meio de análises ultraestruturais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cultivo de cogumelos

As primeiras referências escritas sobre cogumelos estão num epigrama de Eurípedes, datado de 450 AC, no qual é relatada a morte de uma mãe e seus três filhos envenenados por cogumelos (HERRERA, 2001). Hieróglifos escritos há 4600 anos mostram que os egípcios utilizavam os cogumelos em práticas religiosas e acreditavam que eles asseguravam a imortalidade. Em outros documentos foram encontrados vestígios do seu uso por outras civilizações. Há relatos, por exemplo, de que os gregos atribuíam-lhes poderes mágicos, os romanos os viam como “o alimento dos deuses” e os chineses acreditavam que era o “elixir da vida” (FURLANI; GODOY, 2005).

Após serem enquadrados durante longos anos entre os vegetais, os cogumelos foram colocados num reino autônomo denominado Reino Fungi, devido às suas características peculiares (MARTINS, 2004). Neste contexto, os cogumelos pertencem a dois diferentes Filos: o Ascomycota e o Basidiomycota (HAWKSWORTH, 1995).

Estima-se que o primeiro cultivo intencional de cogumelos tenha ocorrido em 600 DC, com a espécie *Auricularia auricula*, na China. Em seguida, a espécie *Flamulina velutipes* no ano 800 DC e a terceira espécie foi o *Lentinula edodes*, o shiitake, no ano de 900 DC. A primeira técnica empregada pelos chineses para a produção de cogumelos consistia em encontrar os troncos de árvores caídos na floresta e colocá-los próximos aos troncos frutificados, que, por sua vez, eram expostos ao vento, para capturar os esporos (HERRERA, 2001). Atualmente, sabe-se que os cogumelos são aptos para crescer em uma grande variedade de substratos, a depender do tipo de nutrição de cada espécie e de suas exigências climáticas (EKANEM; UBENGAMA, 2002). No Brasil,

além da produção em troncos, o seu cultivo tem sido em bagaço, palha da cana, folha de bananeira e serragem, tornando a produção economicamente viável, pois estes materiais são de baixo custo e encontrados com facilidade (FURLANI; GODOY, 2005).

O cogumelo mais cultivado no mundo é o *Agaricus bisporus* (champignon), seguido do *L. edodes* (shiitake), *Pleurotus* spp (cogumelo ostra), *Auricularia auricula* (cogumelo orelha de pau) e *Volvariella volvacea* (cogumelo palha) (SANCHEZ, 2004). Em 2011 a produção mundial de cogumelos foi de aproximadamente 7,7 milhões de toneladas, sendo o *A. bisporus* considerado o cogumelo comestível mais importante economicamente, representando quase metade da produção mundial de cogumelos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014).

A importância dos cogumelos está diretamente ligada ao interesse comercial que estes podem promover, como no ramo da indústria farmacêutica, na recuperação de áreas degradadas e na gastronomia (FUNGOS..., 2014).

A utilização de cogumelos na indústria farmacêutica consiste na produção de substâncias antimicrobianas a partir de extratos – de várias espécies - que apresentam atividade antiviral contra Influenza A (SILVA, 2007). Desta forma, algumas espécies demonstram ter ação imunomoduladora, isto é, atuam ao nível do sistema imunitário, condicionam a resposta imunológica, com efeito anti-tumoral ou imunossupressor (MARTINS, 2004). Além disso, são utilizados para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares como hipertensão, hipercolesterolemia, cancro e diabetes (HELM; CORADIN; KESTRING, 2009).

Os cogumelos desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes na natureza, principalmente no ciclo do carbono, na medida em que são excelentes degradadores de lignina. Ademais, são utilizados na recuperação de áreas degradadas, através da biorremediação, a qual consiste em microrganismos como agentes recuperadores (SOARES et al., 2011).

Inúmeras pesquisas relatam que, em geral, os cogumelos são alimentos de alto valor nutricional, com baixo teor de carboidratos e de gordura, além de possuírem elevados teores de proteínas, fibras e vitaminas dos complexos B, C e D. Características estas que os tornam um suplemento nutricional e dietético ideal (SESLI; TUZEN, 2006; RAI; PAUL, 2007). Além disso, minerais como potássio, cálcio, ferro, zinco, magnésio e fósforo foram também observados em quantidades significativas em diversos gêneros estudados (IACOMINI, 2008). Entretanto, a composição química varia em função das espécies e linhagens, assim como das condições de cultivo – composição do substrato e condições ambientais (temperatura e umidade), estágio de maturação, técnica de colheita e processamento pós-colheita (RIGONI; CORADIN, ROSSO, 2008).

Existem aproximadamente 45 mil espécies de cogumelos descritas na literatura. Destas, cerca de 2.000 são potencialmente comestíveis, mas somente pouco mais de 25 espécies são cultivadas e aceitas como alimento. Ademais, somente 10 espécies têm se tornado produto de larga comercialização, como *A. bisporus*, *L. edodes* e *P. ostreatus* (URBEN; SIQUEIRA, 2003; FURLANI; GODOY, 2007).

Os riscos que a ingestão de cogumelos pode trazer à saúde são devidos à presença de certos contaminantes existentes no meio ambiente ou durante o seu processamento (TAVEIRA; NOVAES, 2007). Dessa forma, os cogumelos comercializados em conservas devem sofrer adição de algumas substâncias. De acordo com o Codex Alimentarius, os ácidos acético (dosagem máxima de 20g/Kg), láctico (dosagem máxima de 5g/Kg), cítrico (dosagem máxima de 5g/Kg) e ascórbico, podem ser utilizados como aditivos em cogumelos (MODA et al., 2005). Assim, a degradação de cogumelos comercializados frescos pode representar um risco para a saúde, por apresentarem um curto tempo de vida útil, limitando-se de um a três dias, à temperatura ambiente, e sob refrigeração, cerca de oito a dez dias. Portanto, o processo de tratamento após a colheita dos

cogumelos deve ser executado o mais rápido e eficientemente possível, devido à sua fácil deterioração. Vale ressaltar que, a qualidade dos cogumelos é refletida tendo em conta diversos parâmetros tais como a cor, textura, estágio de desenvolvimento e contagem microbiana (GONZALEZ-FANDOS et al., 2000).

## **2.2 *Agaricus bisporus***

O *A. bisporus* pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Subfilo Agaricomycotina, Classe Agaricomycetes, Subclasse Agaricomycetidae, Ordem Agaricales, Família Agaricaceae e Gênero *Agaricus* (BICALHO et al., 2013). Os Basidiomicetos apresentam como estrutura característica distintiva do grupo, o basídio, uma estrutura especializada na produção de esporos exógenos, chamados basidiósporos, formados como resultado de cariogamia ou meiose (CAPELARI; GUGLIOTTA; FIGUEIREDO, 1998).

A ordem Agaricales compreende 300 gêneros com cerca de 5 mil representantes comestíveis, medicinais, alucinógenos, micorrízicos, saprófitos, parasitas, entre outros, sendo de grande interesse do ponto de vista alimentício, etnológico, industrial e ecológico (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

Na Europa e na Ásia são comercializadas mais de 50 variedades de cogumelos do gênero *Agaricus*, as quais diferenciam-se uma das outras quanto à forma e cor (liso, escamoso, branco, creme, castanho, marrom), fragilidade, produtividade, resistência a doenças, necessidades nutritivas e condições climáticas (BONONI et al., 1999).

O *A. bisporus* (Champignon de Paris) é uma das espécies mais importantes na indústria de alimentos (NOVAES; NOVAES, 2005) e representa 31,8% da produção mundial de cogumelos comestíveis (CHOUDHARY, 2011). O cultivo de *A. bisporus* teve origem na França, quando cultivadores de melão



perceberam que alguns cogumelos com elevado valor gastronômico (aroma, textura e sabor) cresciam sobre as camas utilizadas para estocagem dos frutos, composta de diversos tipos de palhas (arroz, trigo, aveia) misturadas com esterco de animais (aves, bovinos, equinos). Dois séculos depois, em 1865, o cultivo foi introduzido na América utilizando instalações semelhantes a uma indústria, e posteriormente passou a ser utilizada na Europa (BONONI et al., 1999).

No Brasil o Champignon de Paris foi a primeira espécie a ser cultivada. Segundo a literatura nacional, o início do cultivo em escala comercial parece datar dos anos 50, quando imigrantes italianos fixaram-se em Cabreúva e Atibaia, no estado de São Paulo e, na mesma época, imigrantes chineses instalaram-se em Mogi das Cruzes (BONONI, 2003). As metodologias e tecnologias de cultivo foram sendo aprimoradas, sempre para atender a biologia do fungo. No caso do champignon, durante sua formação e desenvolvimento, é necessário que a temperatura média do ambiente seja de 17-20 °C, o que dificulta seu cultivo em países tropicais, devido à necessidade de climatização para tornar a produção constante ao longo do ano (SIMPÓSIO..., 2006).

Atualmente, a região produtora de cogumelos no Brasil, e que mais se destaca, é a de Mogi das Cruzes. Anualmente, mais de 4 mil toneladas são comercializadas na região, representando cerca de 80% da produção nacional. Portanto, estima-se que a produção brasileira aproxima-se de 5 mil toneladas anuais, representando 0,15% da produção mundial (SAMPAIO; QUEIROZ, 2006).

### 2.3 *Lecanicillium fungicola*

Segundo Fletcher e Gaze (2008) e Largeteau e Savoie (2010), a doença mais importante que afeta a cultura do cogumelo comestível *A. bisporus* é conhecida por “bolha seca” (Dry Bubble). Tem sido relatada cientificamente desde o século 19 por pesquisadores como Constantin e Dufour na França em 1892 e posteriormente por Veihmeyer em 1914 na América. A doença foi também denominada de “La mole” pelos franceses e havia, na ocasião, certa confusão sobre a real identidade do agente etiológico causador das anormalidades presentes nos cultivos de cogumelos. Atualmente, sabe-se que o agente causador da doença bolha seca é o fungo *Lecanicillium fungicola* (BERENDSEN et al., 2010) anteriormente denominado *Verticillium fungicola*.

Zare e Gams (2008), estudando *Verticillium fungicola* através de análises morfológicas e moleculares observaram que a espécie estava bem mais próxima do gênero *Lecanicillium*. Com isso, a espécie *Verticillium fungicola* e sua variedade *aleophilum* foram renomeados a *Lecanicillium fungicola*, enquanto a variedade *flavidum* foi redefinida como *Lecanicillium flavidum*. A espécie *Verticillium psalliotae* também sofreu modificações, passando a ser identificada como *Lecanicillium psalliotae*.

O *L. fungicola* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Subclasse Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, Família Cordycipitaceae e Gênero *Lecanicillium*. Como relatado por Brady e Gibson (1976) e Brady e Waller (1976), a espécie *L. fungicola*, apresenta as seguintes características: 3 a 9 fiálides; as fiálides formam-se em hifas eretas e são curtas e espessas (13-25 x 2-25 µm); e os conídios aparecem em vesículas elipsoidais longas ou cilíndricas, tornando-se mais finas nas extremidades (3-8,5 x 1-1,5 µm).

Sabe-se que *L. fungicola* só é capaz de infectar a fase reprodutiva de *A. bisporus* e, dependendo do tempo de infecção, provoca diferentes sintomas macroscópicos. Quando a infecção é tardia, ou seja, aparece quando os cogumelos apresentam-se desenvolvidos ou em fase de colheita, ocorre o aparecimento de manchas escuras de tonalidade castanha, bordos irregulares e não definidos na superfície do píleo. Essas manchas são comumente pouco profundas e os tecidos situados logo abaixo da camada superficial são em aparência sadios. Podem ocorrer rachaduras, fendilhamentos e consequente descascamento do estipe; sintoma indicativo de que houve invasão dos tecidos do mesmo. Quando tais cogumelos são cortados longitudinalmente, é frequente observar-se uma cavidade interna escurecida. Em virtude disto, os cogumelos tornam-se secos, enrugados e inadequados para o consumo. Um segundo tipo de sintoma ocorre em uma fase intermediária do cultivo, quando em fase de botão, ou seja, quando começam a frutificar. Nesse caso, observa-se uma espécie de estiolamento, isto é, o corpo de frutificação não mais se desenvolve e adquire coloração amarelada. Finalmente, o terceiro tipo de sintoma é indicativo de infecções precoces e mais severas e que significa uma pesada contaminação do composto ou do solo de cobertura. Neste caso, como o micélio do *A. bisporus* está se desenvolvendo no composto e o parasita apresentando a sua fase vegetativa bem desenvolvida, ambos os micélios se entrelaçam. Quando o *A. bisporus* frutifica, dá origem a corpos de frutificação totalmente deformados. Comumente, não há diferenciação entre o estipe e o píleo formando uma massa disforme (BERENDSEN et al., 2010).

Aparentemente, a infecção do *L. fungicola* ocorre pela presença de hidrofibrinas na parede celular de ambos os fungos (VAN WETTER; WÖSTEN; WESSELS, 2000). A parede celular parasita possui glicogalactomananas que são capazes de reconhecer e se ligar a lectina do hospedeiro. A lectina pode ser isolada somente a partir dos basidiomas, o que explica o fato da infecção não

ocorrer na hifa vegetativa (BERNARDO et al., 2004). Largeteau, Regnault-Roger e Savoie (2007) confirmaram que a lectina apresenta-se apenas no tecido do corpo de frutificação e está envolvida no reconhecimento e interação com o hospedeiro.

Após a ligação inicial, o *L. fungicola* pode crescer inter e intracelularmente nas hifas do corpo de frutificação do *A. bisporus*. A invasão ocorre através da combinação de dois processos: o enfraquecimento da parede celular do *A. bisporus* devido à produção de enzimas líticas do *L. fungicola* e por pressão mecânica através da formação do apressório e estruturas de penetração especializadas (DRAGT et al., 1996).

O controle de *L. fungicola* depende estritamente de saneamento e do uso de fungicidas. Dentre os poucos fungicidas que têm sido utilizados, alguns não estão disponíveis e outros estão se tornando cada vez mais ineficazes devido ao desenvolvimento de resistência aos mesmos pelo agente patogênico. Atualmente, o controle da doença bolha seca depende fortemente da utilização de Sportak (composto ativo: procloraz – manganês), no entanto, a redução da sensibilidade a este fungicida tem sido relatada e futuramente este e outros fungicidas serão banidos do comércio (GEA; NAVARRO; TELLO, 2005). As tentativas de implementar agentes de controle biológico (BERENDSEN et al., 2012), ou induzir a resistência ao patógeno (BERENDSEN et al., 2013), não foram bem sucedidas para controlar a doença bolha seca. Dessa forma, são necessárias novas formas de combater a doença bolha seca. Além disso, a elucidação detalhada sobre a interação patógeno-hospedeiro seria importante para o controle da doença e conseqüentemente para a segurança da produção agrícola (BERENDSEN et al., 2010).

## 2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são produtos voláteis do metabolismo secundário de plantas aromáticas, normalmente formados em células especiais ou grupos de células encontrados em muitas folhas e caules de plantas. Eles são comumente concentrados em uma região em particular na planta e, quando ocorrem em vários órgãos em uma mesma planta, possuem diferentes perfis de composição (OUSSALAH et al., 2007). Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são líquidos oleosos aromáticos provenientes de material vegetal, como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes (SIMÕES et al., 2007).

O método de extração de óleos essenciais empregado varia conforme a localização do óleo na planta, o material disponível e com a proposta de sua utilização. Desta forma, as técnicas de extração estão sendo cada vez mais aperfeiçoadas e viabilizam a produção com uma determinada composição e pureza desejada (SIMÕES et al., 2007). Podem ser aplicadas diversas técnicas, como a enfloração, arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO<sub>2</sub> supercrítico. Entretanto, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação (BURT, 2004).

De forma geral, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Entretanto, entre as suas principais características, destacam-se a volatilidade, aroma agradável e solubilidade em solventes orgânicos apolares; diferindo assim dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes (SIMÕES et al., 2007).

Em geral, na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais, os óleos essenciais são muito instáveis; sofrendo inúmeras reações de degradação. Fato que dificulta a sua conservação, fazendo com que seu processo de

armazenamento seja fundamental para a manutenção de sua qualidade (GUIMARÃES et al., 2008).

Podem apresentar até 60 componentes em concentrações variáveis, sendo que, na maioria das vezes, um ou dois deles são encontrados em proporções maiores (20-70%), denominados compostos majoritários. Vale ressaltar que, os outros componentes só estão presentes em concentrações vestigiais (traços) (BAKKALI et al., 2008). Desta forma, a constituição química é muito variada, incluindo hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Além disso, a composição do óleo essencial de uma planta é também determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para determinado órgão e característica do seu estágio de desenvolvimento (BANDONI; CZEPAK, 2008). Contudo, as condições ambientais são capazes de causar variações, como a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal.

O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influenciam a composição química dos óleos essenciais (BURT, 2004). Desta forma, a composição pode também diferir entre as estações de colheitas e condições geográficas (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Apesar da complexidade da composição, os constituintes dos óleos pertencem de forma quase exclusiva a duas séries, caracterizada por suas origens biossintéticas distintas: a série terpênica e a série, menos frequente, dos fenilpropanóides (CARDOSO et al., 2001; BANDONI; CZEPAK, 2008).

### 2.4.1 Biossíntese de terpenóides

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 1). A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico. Os esqueletos de carbono dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades isoprênicas. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (SIMÕES et al., 2007).

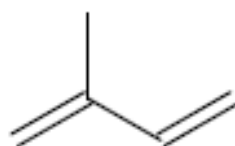


Figura 1 Estrutura química do isopreno

Os terpenóides são sintetizados via mevalonato, o qual é formado pela condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com a acetil-CoA, seguida de uma hidrólise, formando o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Em seguida, o HMG-CoA sofre uma reação de redução catalisada pela enzima HMGCoA-redutase à mevalonato. Esse é, então, convertido em isoprenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalilpirofosfato (DMAPP). As moléculas de IPP e DMAPP condensam e formam o trans-geranil-pirofosfato, dando origem aos monoterpenos (10 carbonos) e sesquiterpenos (15 carbonos) (Figura 2) (SIMÕES et al., 2004).

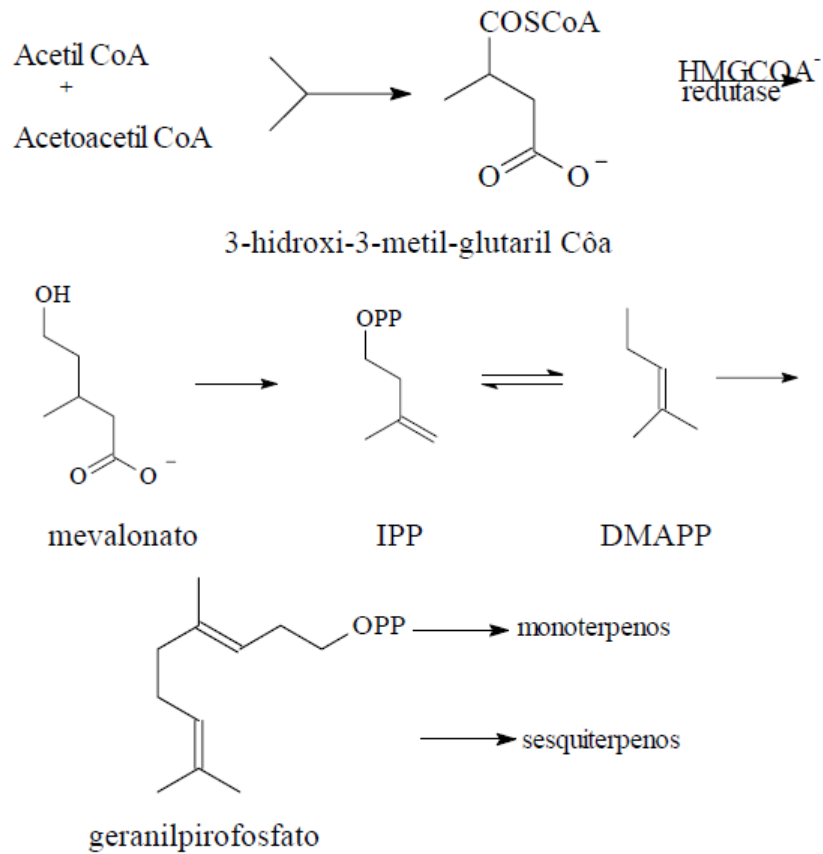


Figura 2 Biossntese de terpenos via mevalonato

Fonte: (SIMÕES et al., 2004).

Outra rota de biossntese de terpenos é a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, conhecida como via DXPS. Inicia-se com a condensação de uma molécula de piruvato e outra D-gliceraldeído-3-fosfato, formando a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato; após reações sucessivas, a molécula de IPP e DMAPP são formadas, dando origem aos terpenos (Figura 3) (DEWICK, 2002).



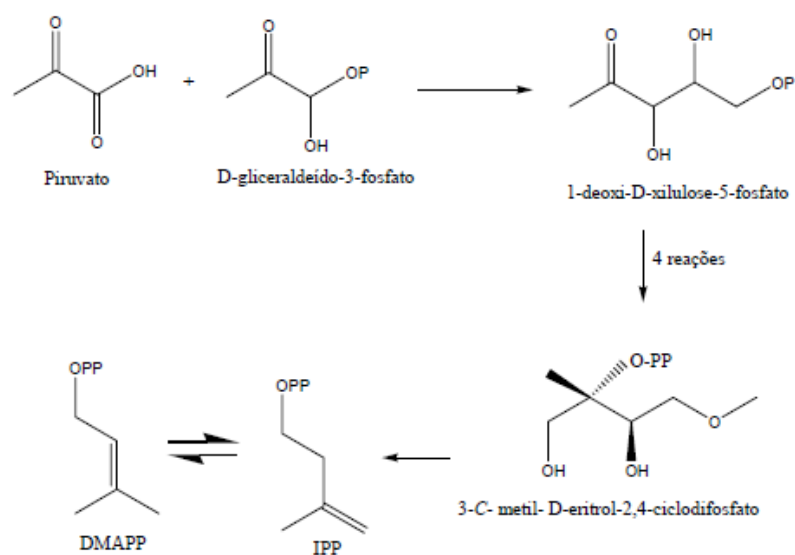


Figura 3 Biossíntese de terpenos via DXPS

Fonte: (DEWICK, 2002).

#### 2.4.2 Biossíntese de fenilpropanóides

Os fenilpropanóides são menos abundantes do que os terpenóides e possuem em suas estruturas um anel benzênico com uma cadeia lateral composta de três carbonos, que apresentam uma dupla ligação e podem ter um grupo funcional com oxigênio, como ilustra a Figura 4 (TAIZ; ZEIGER, 2004).

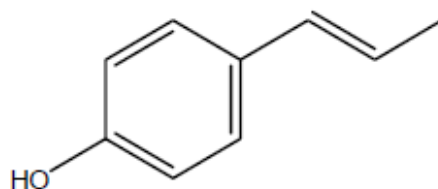


Figura 4 Representação química básica de um fenilpropanóide

Os fenilpropanóides são compostos aromáticos que derivam da rota que inicia com a formação do ácido chiquímico. Esse dá origem aos aminoácidos fenilalanina e tirosina, os quais por ação enzimática da fenilalanina amonialiase (FAL), perdem uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e p-cumárico (Figura 5). Finalmente, por meio de várias reações de redução, oxidação e ciclização, os ácidos cinâmico e p-cumárico levam à formação de fenilpropanóides (SIMÕES et al., 2007).

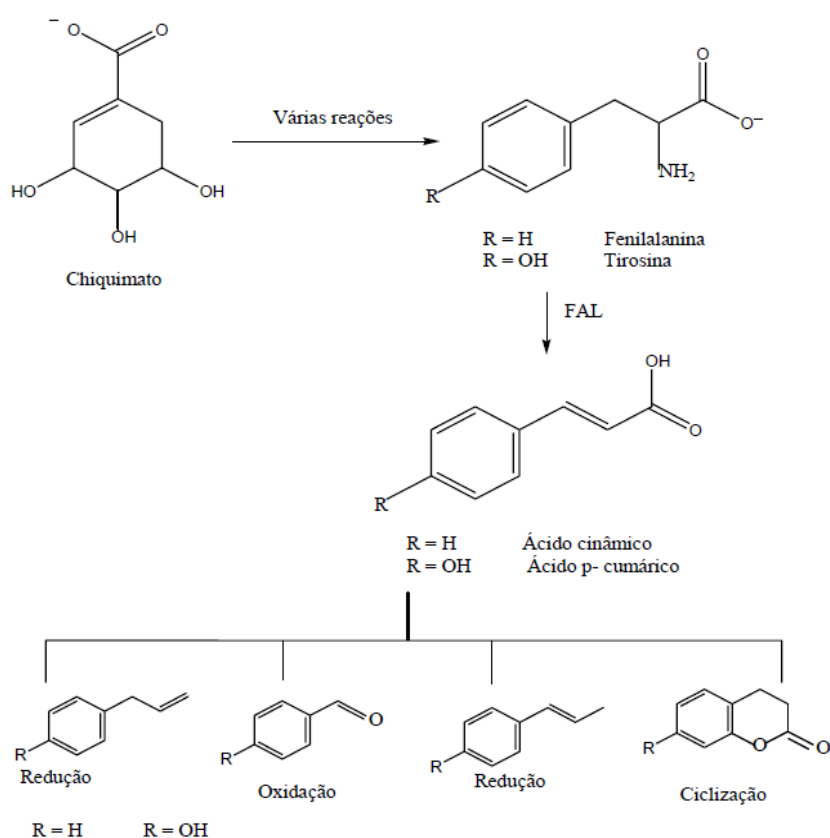


Figura 5 Biossíntese de fenilpropanóides

Fonte: (SIMÕES et al., 2007).

### 2.4.3 Atividade biológica dos óleos essenciais

O crescente interesse dos consumidores por alimentos naturais obriga a indústria a pesquisar novas alternativas de conservação de alimentos. Assim, o uso de óleos essenciais em alimentos vem ganhando importância devido ao fato destes apresentarem componentes naturais, evitando-se o uso de aditivos sintéticos, demonstrando sua ação fungicida, bactericida e inseticida (PERINI et al., 2013; KNAAK; FIUZA, 2010; OOTANI et al., 2011). Ademais, são menos perigosos aos seres humanos, em comparação aos produtos sintéticos, e menos tóxicos ao meio ambiente, devido à volatilização de seus compostos (SATISH et al., 2007; PARK et al., 2006).

A atividade antimicrobiana depende do tipo, da composição e da concentração da espécie ou do óleo essencial, do tipo do microrganismo em questão, da composição do substrato, do processamento e da condição de estocagem (MARINO; BERSANI; COMI, 2001).

Apesar do conhecimento limitado sobre os mecanismos de ação dos óleos, estes parecem estar associados ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células microbianas (CONNER, 1993; SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995). De acordo com Piper et al. (2001), determinados terpenos presentes nos óleos essenciais são capazes de tornar a membrana celular do fungo permeável, causando o vazamento de seu conteúdo.

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleos essenciais têm indicado o potencial destes no controle de fitopatógenos, tanto por ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas (STANGARLIN et al., 1999). Em estudos desenvolvidos por Zambonelli et al. (1996), testando óleo de tomilho em fitopatógenos, foi verificado que esse composto causou degeneração das hifas e

extravasamento do citoplasma celular. Chalfoun et al. (2004) avaliaram o efeito *in vitro* de óleos essenciais dos condimentos alho, canela, cravo e tomilho testados em concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 mg/mL, e do óleo de cravo nas concentrações de 200, 400, 600 e 800 mg/mL, sobre o crescimento micelial dos fungos *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* De Bary e *Aspergillus niger* e constataram uma inibição total do óleo de canela sobre fungos testados, os óleos de tomilho e alho tiveram o mesmo efeito nas concentrações mais altas, o cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos a partir da concentração de 600 mg/mL, exceto o fungo *Penicillium* spp. que foi verificado na concentração de 800 mg/mL.

Dessa forma, os óleos essenciais apresentam grande potencial para o manejo integrado de doenças fúngicas, uma vez que diferentes autores observaram efeitos tóxicos desses compostos sobre fungos. Vale ressaltar, ainda, um fator ecológico importante dos óleos essenciais, devido à sua alta volatilidade, eles não se acumulam em solos nem em águas subterrâneas (DHIMA et al., 2010; GROSSO et al., 2010).

## **2.5 Uso da microscopia eletrônica no estudo da interação fungo-cogumelo**

O surgimento dos microscópios eletrônicos de transmissão e de varredura permitiu o estudo de amostras frescas e o mínimo de manipulação possível durante o processamento (COLLINS et al., 1993). Dessa forma, a microscopia eletrônica é considerada uma importante ferramenta de estudos ultraestruturais, principalmente para o entendimento de processos relacionados ao desenvolvimento de doenças, como, por exemplo, em cogumelos. Os eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas, tais como, adesão, penetração, colonização e reprodução ocorrem em nível celular, tanto do patógeno como do hospedeiro. Assim, Alves, Leite e Kitajima (2008) ressaltam

que, para visualizar tais processos de infecção, o microscópio de luz, o microscópio eletrônico de transmissão e o microscópio eletrônico de varredura têm proporcionado inestimáveis contribuições. Neste contexto, Ware (1933) e North e Wuest (1993) utilizaram a microscopia eletrônica de varredura (MEV), porém não observaram estruturas de penetração especializadas ou evidências de uma penetração direta do patógeno. No entanto, Dragt et al. (1996) observaram evidência de penetração direta e estruturas de penetração especializadas do micoparasita *L. fungicola* em *A. bisporus*, através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Tal fato foi confirmado por Calonje et al. (1997). A resistência do micélio vegetativo de *A. bisporus* ao *L. fungicola* também tem sido analisada por microscopia eletrônica (CALONJE et al., 2000; SHAMSHAD; CLIFTA; MANSFIELD, 2009).

Apesar dos estudos envolvendo esse patossistema, nenhum estudo ultraestrutural foi encontrado em relação ao mecanismo de ação de óleos essenciais no controle da doença. Desta forma, a compreensão da ação dos óleos essenciais na interação entre o hospedeiro e o patógeno será de grande importância para a obtenção de novas técnicas que visam melhorias e medidas sustentáveis no cultivo de cogumelos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local do estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### **3.2 Obtenção dos isolados de *Lecanicillium fungicola***

Os isolados de *L. fungicola*, denominados LF.1 e LF.2, foram obtidos na coleção de cultura do Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia da UFLA. Sendo que as duas linhagens apresentam origens diferentes, pois foram isoladas de locais distintos. A manutenção dos isolados fez-se pelo método tradicional mediante repicagens sucessivas em meio BDA (batata-dextrose-ágar), em placas de Petri e mantido a 25°C.

#### **3.3 Material vegetal**

Os óleos essenciais foram selecionados mediante potencial antifúngico, observados em testes *in vitro* por Regnier e Combrinck (2010) e Tanović et al. (2009), e em função da disponibilidade destes no comércio (Tabela 1).

Tabela 1 Óleos essenciais selecionados para a avaliação de atividade antifúngica sobre *L. fungicola*

<b>Nome científico</b>	<b>Nome comum</b>
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto
<i>Melissa officinalis</i>	Erva-cidreira
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano
<i>Syzygium aromaticum</i>	Cravo-da-Índia
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho

Foram adquiridos 2Kg de cada material vegetal no Mercado Municipal da cidade de Belo Horizonte. Estes foram posteriormente picados, pesados, e imediatamente utilizados na extração de óleos essenciais.

### 3.4 Extração

A extração dos óleos essenciais dos vegetais foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da UFLA. O método empregado para a extração dos óleos essenciais foi a hidrodestilação, conforme descrito por Guimarães et al. (2008), utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado, adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 5 litros.

Individualmente, as folhas secas de erva-cidreira e eucalipto foram picadas, a canela em pau foi quebrada com auxílio de um martelo, e juntamente com o tomilho, o orégano e o cravo todos foram recobertos com água dentro do balão, o qual foi colocado sobre uma manta aquecedora. A extração dos óleos essenciais foi realizada por um período de 2 horas, mantendo a solução em ebulição. Em seguida, o hidrolato obtido foi centrifugado em centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby® I Modelo 206 BL) a 965,36 XG por 5 minutos. Após centrifugação, os óleos essenciais foram retirados com o

auxílio de uma micropipeta de Pasteur e acondicionados em frasco de vidro âmbar.

Posteriormente, os óleos essenciais foram armazenados sob refrigeração em frasco totalmente vedado, em ambiente escuro, com o objetivo de evitar degradações, com conseqüente perda de qualidade e alteração da composição química.

Foram realizadas duas extrações de óleos essenciais para cada espécie vegetal analisada.

### **3.5 Avaliação das concentrações de cada óleo essencial por meio do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM)**

Para a avaliação do efeito *in vitro* dos compostos de plantas sobre o crescimento micelial das linhagens LF.1 e LF.2 foram utilizadas as concentrações 0,2%, 0,4%, 0,8% e 1,6% v/v (TANOVIĆ et al., 2009). Em seguida, foram preparadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro com o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) previamente esterilizado (em autoclave a 121°C, 1 atm, por 20 minutos). Foi realizada a pré-diluição de cada óleo essencial em uma solução de leite em pó comercial estéril (10g.L<sup>-1</sup>). Em seguida, 1 mL dessa solução foi diluída em 9 mL do meio de cultura BDA momentos antes da solidificação, de modo a obter meio de cultura com as diferentes concentrações dos óleos a serem avaliados. No centro de cada placa foi efetuada a repicagem de um disco de 5 mm de diâmetro, contendo micélio da cultura monospórica previamente crescida por 7 dias em BDA. Após este procedimento, as placas foram vedadas com filme plástico e acondicionadas em incubadora do tipo BOD a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas (AQUINO et al., 2014).

Os tratamentos empregados foram seis óleos essenciais em quatro concentrações diferentes, um padrão de inibição do crescimento micelial



constituído pelo fungicida Sportak, além de uma testemunha constituída pelo disco de micélio do fungo sobre o meio de cultura composto por 9 mL de BDA e 1 mL da solução de leite em pó ( $10\text{g.L}^{-1}$ ) e a testemunha absoluta; totalizando 54 tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 Tratamentos empregados na avaliação do Índice de Crescimento Micelial (IVCM)

<b>Tratamentos</b>	
<b>1</b>	BDA/LF.1
<b>2</b>	BDA/LF.2
<b>3</b>	BDA + Leite em pó/LF.1
<b>4</b>	BDA + Leite em pó/LF.2
<b>5</b>	BDA + Fungicida Sportak/LF.1
<b>6</b>	BDA + Fungicida Sportak/LF.2
<b>7</b>	BDA + Óleo de canela (0,2%)/LF.1
<b>8</b>	BDA + Óleo de canela (0,4%)/LF.1
<b>9</b>	BDA + Óleo de canela (0,8%)/LF.1
<b>10</b>	BDA + Óleo de canela (1,6%)/LF.1
<b>11</b>	BDA + Óleo de canela (0,2%)/LF.2
<b>12</b>	BDA + Óleo de canela (0,4%)/LF.2
<b>13</b>	BDA + Óleo de canela (0,8%)/LF.2
<b>14</b>	BDA + Óleo de canela (1,6%)/LF.2
<b>15</b>	BDA + Óleo de cravo (0,2%)/LF.1
<b>16</b>	BDA + Óleo de cravo (0,4%)/LF.1
<b>17</b>	BDA + Óleo de cravo (0,8%)/LF.1
<b>18</b>	BDA + Óleo de cravo (1,6%)/LF.1
<b>19</b>	BDA + Óleo de cravo (0,2%)/LF.2
<b>20</b>	BDA + Óleo de cravo (0,4%)/LF.2
<b>21</b>	BDA + Óleo de cravo (0,8%)/LF.2
<b>22</b>	BDA + Óleo de cravo (1,6%)/LF.2
<b>23</b>	BDA + Óleo de tomilho (0,2%)/LF.1
<b>24</b>	BDA + Óleo de tomilho (0,4%)/LF.1
<b>25</b>	BDA + Óleo de tomilho (0,8%)/LF.1
<b>26</b>	BDA + Óleo de tomilho (1,6%)/LF.1
<b>27</b>	BDA + Óleo de tomilho (0,2%)/LF.2
<b>28</b>	BDA + Óleo de tomilho (0,4%)/LF.2
<b>29</b>	BDA + Óleo de tomilho (0,8%)/LF.2
<b>30</b>	BDA + Óleo de tomilho (1,6%)/LF.2

“Tabela 2, conclusão”

<b>Tratamentos</b>	
<b>31</b>	BDA + Óleo de erva-cidreira (0,2%)/LF.1
<b>32</b>	BDA + Óleo de erva-cidreira (0,4%)/LF.1
<b>33</b>	BDA + Óleo de erva-cidreira (0,8%)/LF.1
<b>34</b>	BDA + Óleo de erva-cidreira (1,6%)/LF.1
<b>35</b>	BDA + Óleo de erva-cidreira (0,2%)/LF.2
<b>36</b>	BDA + Óleo de erva-cidreira (0,4%)/LF.2
<b>37</b>	BDA + Óleo de erva-cidreira (0,8%)/LF.2
<b>38</b>	BDA + Óleo de erva-cidreira (1,6%)/LF.2
<b>39</b>	BDA + Óleo de eucalipto (0,2%)/LF.1
<b>40</b>	BDA + Óleo de eucalipto (0,4%)/LF.1
<b>41</b>	BDA + Óleo de eucalipto (0,8%)/LF.1
<b>42</b>	BDA + Óleo de eucalipto (1,6%)/LF.1
<b>43</b>	BDA + Óleo de eucalipto (0,2%)/LF.2
<b>44</b>	BDA + Óleo de eucalipto (0,4%)/LF.2
<b>45</b>	BDA + Óleo de eucalipto (0,8%)/LF.2
<b>46</b>	BDA + Óleo de eucalipto (1,6%)/LF.2
<b>47</b>	BDA + Óleo de orégano (0,2%)/LF.1
<b>48</b>	BDA + Óleo de orégano (0,4%)/LF.1
<b>49</b>	BDA + Óleo de orégano (0,8%)/LF.1
<b>50</b>	BDA + Óleo de orégano (1,6%)/LF.1
<b>51</b>	BDA + Óleo de orégano (0,2%)/LF.2
<b>52</b>	BDA + Óleo de orégano (0,4%)/LF.2
<b>53</b>	BDA + Óleo de orégano (0,8%)/LF.2
<b>54</b>	BDA + Óleo de orégano (1,6%)/LF.2

BDA – Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar

As avaliações foram realizadas por meio de medições diárias do diâmetro das colônias, onde foram coletados os dados referentes à média de duas medidas diametricamente opostas.

O início das avaliações ocorreu 24 horas após o preparo das placas, e terminou no décimo dia. Após esse período, determinou-se o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) utilizando a equação adaptada por Oliveira (1991):

$$IVCM = \sum \frac{(D - Da)}{N}, \text{ em que:}$$

IVCM – Índice de velocidade de crescimento micelial;

D - diâmetro médio atual;

Da - diâmetro médio do dia anterior;

N - número de dias após a inoculação.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (óleos x concentrações x linhagens) com três repetições, cada placa constituindo uma unidade experimental. Os dados foram analisados utilizando-se o software Sisvar (FERREIRA, 2000). Os tratamentos foram submetidos à análise de variância, regressão, e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

### **3.6 Avaliação da germinação de conídios submetidos à exposição direta de óleos essenciais em diferentes concentrações**

Foi avaliada a atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre a germinação de conídios das linhagens LF.1 e LF.2, utilizando as mesmas concentrações dos seis óleos do ensaio anterior. Dessa maneira, foram preparadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro com o meio de cultura Ágar-Água (AA) a 2%, previamente esterilizado. Foi realizada a pré-diluição de cada óleo essencial em uma solução de leite em pó comercial estéril ( $10\text{g.L}^{-1}$ ), em seguida 1 mL dessa solução foi diluída a 9 mL do meio de cultura AA momentos antes da solidificação, de modo a obter meio de cultura com as diferentes concentrações dos óleos a serem avaliados. Em cada placa foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de suspensão de esporos de *L. fungicola* ajustada para  $1 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ; previamente obtida por meio da adição de 10

mL de água estéril, raspagem do micélio da cultura monospórica, crescida por 7 dias em BDA, com alça de Drigalski, filtragem da suspensão de esporos em gaze e quantificação em câmara de Neubauer. Em seguida, as placas foram vedadas com filme plástico e acondicionadas em incubadora do tipo BOD a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas.

Utilizando um microscópio de luz, foram contabilizados 50 esporos por área (2cm<sup>2</sup>), registrando-se a porcentagem de conídios germinados após 20 horas de incubação. O ensaio foi composto por três repetições para cada tratamento, totalizando 150 esporos. A ausência de qualquer crescimento caracterizou a atividade antifúngica positiva, assim como os esporos que apresentaram qualquer emissão de tubo germinativo foram considerados como germinados, ou seja, atividade antifúngica negativa (ITAKO et al., 2008).

Além dos tratamentos compostos pelos seis óleos essenciais em quatro repetições, foi utilizado o fungicida Sportak como padrão de inibição, e as testemunhas compostas pela solução de leite em pó (10g.L<sup>-1</sup>) e a testemunha absoluta. Totalizando 54 tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 Tratamentos empregados na avaliação da Porcentagem de Germinação (PGERM)

<b>Tratamentos</b>	
1	AA/LF.1
2	AA/LF.2
3	AA + Leite em pó/LF.1
4	AA + Leite em pó/LF.2
5	AA + Fungicida Sportak/LF.1
6	AA + Fungicida Sportak/LF.2
7	AA + Óleo de canela (0,2%)/LF.1
8	AA + Óleo de canela (0,4%)/LF.1
9	AA + Óleo de canela (0,8%)/LF.1
10	AA + Óleo de canela (1,6%)/LF.1
11	AA + Óleo de canela (0,2%)/LF.2
12	AA + Óleo de canela (0,4%)/LF.2
13	AA + Óleo de canela (0,8%)/LF.2
14	AA + Óleo de canela (1,6%)/LF.2
15	AA + Óleo de cravo (0,2%)/LF.1
16	AA + Óleo de cravo (0,4%)/LF.1
17	AA + Óleo de cravo (0,8%)/LF.1
18	AA + Óleo de cravo (1,6%)/LF.1
19	AA + Óleo de cravo (0,2%)/LF.2
20	AA + Óleo de cravo (0,4%)/LF.2
21	AA + Óleo de cravo (0,8%)/LF.2
22	AA + Óleo de cravo (1,6%)/LF.2
23	AA + Óleo de tomilho (0,2%)/LF.1
24	AA + Óleo de tomilho (0,4%)/LF.1
25	AA + Óleo de tomilho (0,8%)/LF.1
26	AA + Óleo de tomilho (1,6%)/LF.1
27	AA + Óleo de tomilho (0,2%)/LF.2
28	AA + Óleo de tomilho (0,4%)/LF.2
29	AA + Óleo de tomilho (0,8%)/LF.2
30	AA + Óleo de tomilho (1,6%)/LF.2
31	AA + Óleo de erva-cidreira (0,2%)/LF.1
32	AA + Óleo de erva-cidreira (0,4%)/LF.1
33	AA + Óleo de erva-cidreira (0,8%)/LF.1
34	AA + Óleo de erva-cidreira (1,6%)/LF.1
35	AA + Óleo de erva-cidreira (0,2%)/LF.2
36	AA + Óleo de erva-cidreira (0,4%)/LF.2
37	AA + Óleo de erva-cidreira (0,8%)/LF.2
38	AA + Óleo de erva-cidreira (1,6%)/LF.2
39	AA + Óleo de eucalipto (0,2%)/LF.1

“Tabela 3, conclusão”

<b>Tratamentos</b>	
<b>40</b>	AA + Óleo de eucalipto (0,4%)/LF.1
<b>41</b>	AA + Óleo de eucalipto (0,8%)/LF.1
<b>42</b>	AA + Óleo de eucalipto (1,6%)/LF.1
<b>43</b>	AA + Óleo de eucalipto (0,2%)/LF.2
<b>44</b>	AA + Óleo de eucalipto (0,4%)/LF.2
<b>45</b>	AA + Óleo de eucalipto (0,8%)/LF.2
<b>46</b>	AA + Óleo de eucalipto (1,6%)/LF.2
<b>47</b>	AA + Óleo de orégano (0,2%)/LF.1
<b>48</b>	AA + Óleo de orégano (0,4%)/LF.1
<b>49</b>	AA + Óleo de orégano (0,8%)/LF.1
<b>50</b>	AA + Óleo de orégano (1,6%)/LF.1
<b>51</b>	AA + Óleo de orégano (0,2%)/LF.2
<b>52</b>	AA + Óleo de orégano (0,4%)/LF.2
<b>53</b>	AA + Óleo de orégano (0,8%)/LF.2
<b>54</b>	AA + Óleo de orégano (1,6%)/LF.2

AA – Meio de cultura Ágar-Água

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (óleos x concentrações x linhagens) x 3 repetições, cada área de (2cm<sup>2</sup>) da placa constituiu uma unidade experimental. Os dados foram analisados utilizando-se o software Sisvar (FERREIRA, 2000). Os tratamentos foram submetidos à análise de variância, regressão, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

### **3.7 Estudo da interação entre o patógeno *L. fungicola* e o hospedeiro *A.***

#### ***bisporus* por microscopia eletrônica de varredura**

O composto foi obtido comercialmente pela empresa Sítio dos Micélios, localizada em Barbacena-MG. Adicionou-se uma camada de cobertura para a indução da frutificação dos basidiocarpos, contendo Latossolo vermelho distroférico e calcário calcítico (v:v), a qual foi agregada após 14 dias, quando o micélio já havia colonizado totalmente o substrato de cultivo. Após sete dias de

adição da camada de cobertura, os compostos foram incubados a  $18 \pm 1$  °C, até a frutificação. Posteriormente à frutificação, os cogumelos foram colhidos. Inicialmente, para o preparo da suspensão de esporos, o *L. fungicola* foi cultivado em meio BDA, por um período de 7 dias a 25°C. Em seguida, 5 mL de uma suspensão de esporos ( $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) foram borrifados em toda a superfície dos cogumelos, os quais foram dispostos em câmara úmida e incubados em BOD a 25°C.

A microscopia eletrônica de varredura foi feita com os basidiocarpos inoculados com *L. fungicola*, os quais foram cortados à mão livre com bisturi em pedaços do píleo de no máximo 2cm<sup>2</sup>. As coletas foram realizadas nos tempos 13, 16, 19 e 23 horas após a inoculação. Em seguida, as amostras coletadas foram colocadas em microtubos de 1,5mL contendo fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0% em tampão de cacodilato de sódio 0,05M, CaCl<sub>2</sub> 0,001M, pH 7,2) e, armazenadas em geladeira, a 4°C por um período de, no mínimo, 24 horas.

Após a fixação, foi utilizado o protocolo padrão para microscopia eletrônica de varredura descrita por Bozzola e Russel (1999) e adaptado por Alves (2004).

As amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,05 M por três vezes de 10 minutos cada e transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água, por no mínimo 1 hora. Posteriormente, foram lavadas em água destilada por três vezes e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100%, por três vezes).

Após a desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030, para substituição da acetona por CO<sub>2</sub> e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio (*stubs*) com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050, para observação

em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens geradas foram gravadas e abertas no software Photopaint do pacote Corel Draw X6, para preparação das pranchas.



## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Avaliação das concentrações de cada óleo essencial por meio do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM)**

De acordo com a análise de variância para a variável IVCM a interação tripla (óleo x concentração x linhagem) não foi significativa ( $p > 0,05$ ) (ANEXO A). Dessa forma, foram analisadas apenas as interações óleo x concentração e óleo x linhagem, as quais foram significativas pela análise de variância ( $p < 0,05$ ) (ANEXO A). As concentrações de cada óleo foram analisadas por regressão e os resultados estão representados na figura 6.

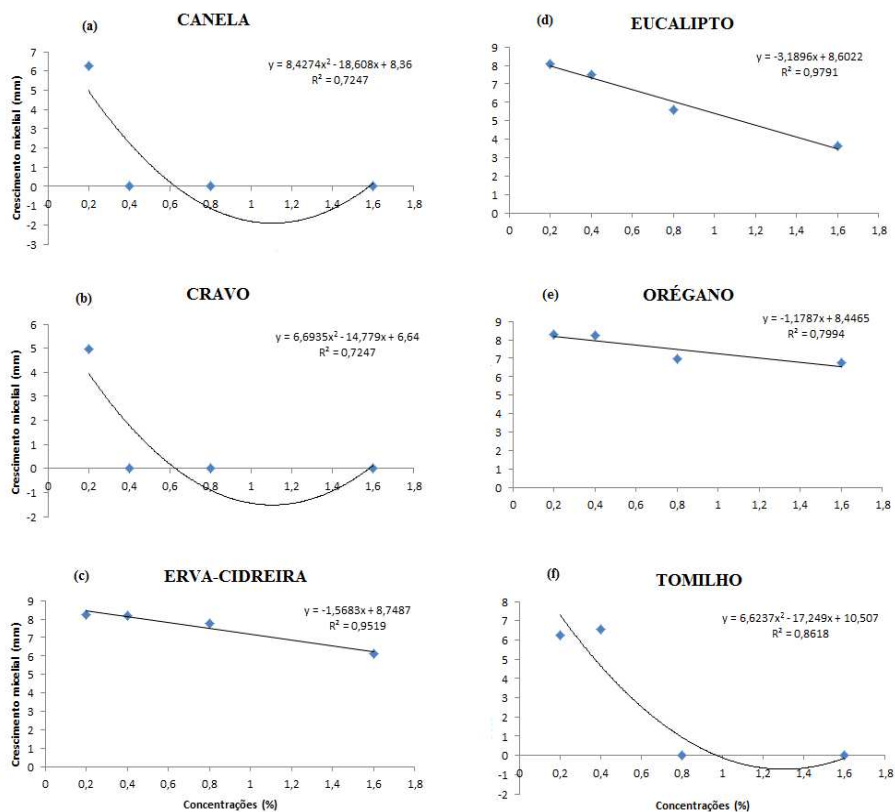


Figura 6 Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) do fungo *Lecanicillium fungicola* em meio de cultura BDA acrescido de óleo essencial de canela (a), óleo de cravo (b), óleo de erva-cidreira (c), óleo de eucalipto (d), óleo de orégano (e) e óleo de tomilho (f)

Levando-se em consideração o b (b<sub>0</sub>, b<sub>1</sub> e b<sub>2</sub>) e o coeficiente de determinação ajustado da análise de regressão ( $R^2$ ), o modelo quadrático foi o que melhor se adequou aos dados dos óleos de canela, cravo e tomilho. Enquanto que para os óleos de erva-cidreira, eucalipto e orégano o modelo que melhor representou os dados foi o linear (figura 6).

Os maiores valores do IVCM foram encontrados para a concentração 0,2% no tratamento com orégano (e), que chegou a 8,28mm, seguido do

tratamento com erva-cidreira (c), com 8,2mm e por último o tratamento com eucalipto (d) com 8,07mm. Tais tratamentos apresentaram redução no IVC, conforme o aumento no valor da concentração dos óleos. No entanto, estes óleos não foram capazes de inibir totalmente o crescimento micelial de *L. fungicola*.

Barrera-Necha et al. (2008) verificaram que o óleo de *Eucalyptus globulus* não demonstrou inibição no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de mamão (*Carica papaya* L.), nas diferentes concentrações, concordando com os resultados obtidos neste trabalho. Entretanto, resultados contrastantes foram obtidos por Soyly, Soyly e Kurt (2006), visto que foi constatada a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano, mediante inibição total do crescimento micelial de *Phytophthora infestans*. No mesmo contexto, Tagami et al. (2009) demonstraram que o extrato bruto de *Lippia alba* apresentou ação fungitóxica sobre o crescimento micelial do fungo *Alternaria alternata* e *C. graminicola*.

Os tratamentos com canela (a) e cravo (b) apresentaram as médias 6,27mm e 4,98mm do IVC, na concentração 0,2%, respectivamente. Porém, a partir da concentração 0,4% a inibição no crescimento micelial foi 100%. No entanto, o tratamento com óleo de tomilho (f) apresentou um IVC de 6,24mm na concentração 0,2%, seguido de 6,56mm na concentração 0,4%. Somente a partir da concentração 0,8% o óleo foi capaz de inibir completamente o crescimento micelial (figura 6).

Resultados parecidos foram encontrados no trabalho de Souza et al. (2004), os quais avaliaram o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e canela sobre o desenvolvimento micelial de *Rhizopus* sp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*. Verificou-se que o óleo essencial de canela inibiu completamente o desenvolvimento micelial destes na concentração de 200 $\mu$ L L<sup>-1</sup>, enquanto os óleos essenciais de cravo-da-índia e tomilho apresentaram tal inibição nas concentrações de 600 $\mu$ L L<sup>-1</sup>.

As médias do desdobramento do fator linhagem dentro de cada nível de óleo para a variável IVCM foram analisadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade (Tabela 4).

Tabela 4 Desdobramento do fator linhagem (LF.1 e LF.2) dentro do fator óleo essencial para a variável Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) do fungo *Lecanicillium fungicola* em meio de cultura BDA

ÓLEO	LINHAGENS*	
	LF.1	LF.2
CANELA	1,66Ab	1,47Aa
CRAVO	0,98Aa	1,51Aa
ERVA-CIDREIRA	6,72Ae	8,42Bd
EUCALIPTO	5,22Ad	7,20Bc
ORÉGANO	7,18Ae	7,94Bd
TOMILHO	2,90Ac	3,50Bb

\* Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O efeito dos óleos de canela e cravo não diferiram entre as linhagens ( $p>0,05$ ), ou seja, as médias de crescimento micelial para ambas as linhagens foram iguais. Portanto, as linhagens responderam da mesma maneira aos tratamentos com os óleos de canela e cravo, os quais apresentam os menores valores de IVCM.

No entanto, para os tratamentos com os óleos de erva-cidreira, eucalipto, orégano e tomilho, houve diferença entre as médias das duas linhagens.

Já para o desdobramento do fator óleo dentro de cada nível de linhagem, observou-se que a linhagem LF.1 apresentou reações diferentes em relação aos 5 óleos. Sendo o óleo de cravo o melhor tratamento, pois apresentou o menor IVCM (0,98mm/dia), os tratamentos menos eficientes foram os óleos de erva-cidreira e orégano, com 6,72mm e 7,18mm de crescimentos, respectivamente. Por outro lado, a linhagem LF.2 teve um comportamento estatisticamente igual

para os óleos de canela (1,47mm/dia) e cravo (1,51mm/dia), sendo estes os tratamentos mais eficientes. Porém, os óleos de orégano e erva-cidreira foram novamente os menos eficientes, por apresentarem os maiores valores de IVCN, 7,94mm/dia e 8,42mm/dia, respectivamente.

Com base nestes resultados é possível observar respostas diferentes aos óleos essenciais das duas linhagens, fato que se deve, provavelmente, à sua distinta origem. Contudo, os óleos de canela, cravo e tomilho continuam apresentando os resultados mais eficientes; assim como os menos eficientes no controle do crescimento micelial são os óleos de orégano, erva-cidreira e eucalipto.

Realizada a comparação entre os tratamentos constituídos por óleos essenciais, com as testemunhas (BDA e BDA + solução de leite em pó) e o fungicida, para a variável IVCN, demonstrou-se haver diferença significativa (ANEXO A). Desta forma, as médias foram submetidas à análise pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Figura 7).

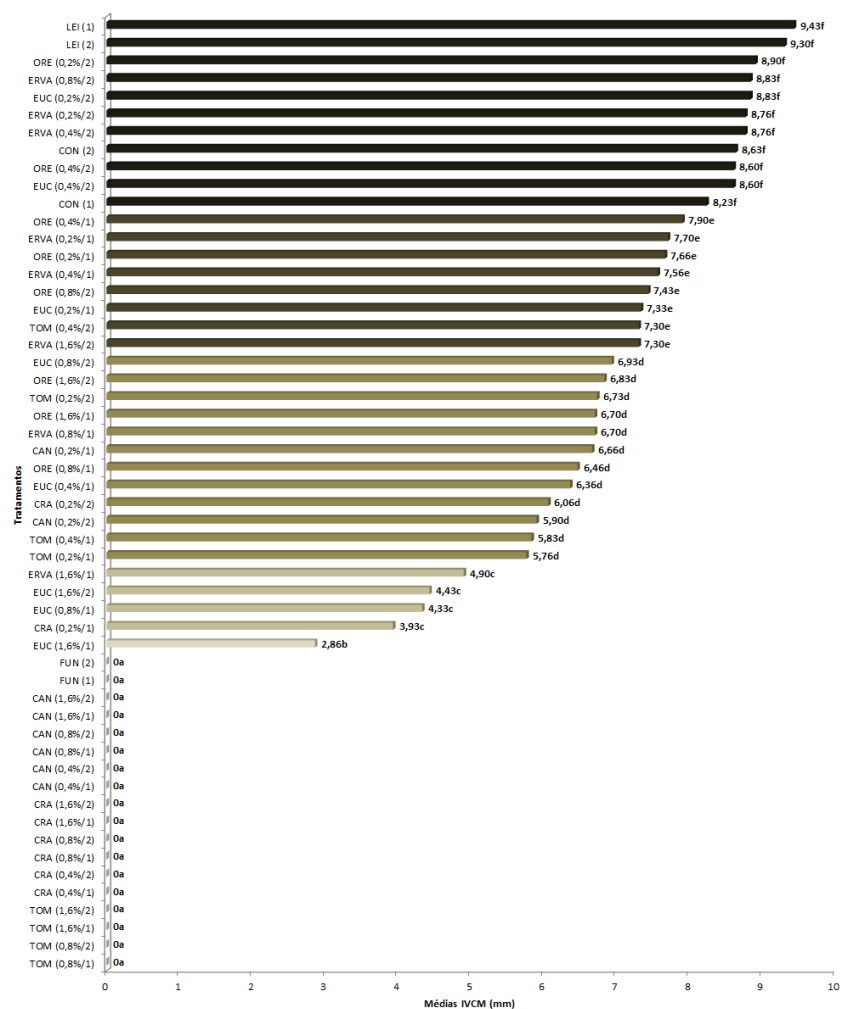


Figura 7 Médias dos tratamentos para a variável Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) do fungo *Lecanicillium fungicola* em meio de cultura BDA. TOM – óleo essencial de tomilho; CRA – óleo essencial de cravo; CAN – óleo essencial de canela; FUN – fungicida Sportak; EUC – óleo essencial de eucalipto; ERVA – óleo essencial de erva-cidreira; ORE – óleo essencial de orégano; CON – controle absoluto; LEI – controle com leite; 1 – linhagem LF.1; 2 – linhagem LF.2

Nota: Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os tratamentos fungicidas Sportak, os óleos de canela e cravo na concentração de 0,4%, 0,8% e 1,6% e o óleo de tomilho a 0,8% e 1,6%, apresentaram o mesmo nível de controle de crescimento (100%) para as duas linhagens; sendo, portanto, considerados os melhores tratamentos em relação ao controle do crescimento micelial de *L. fungicola*. Em seguida, observou-se uma redução intermediária no controle de crescimento por parte da maioria dos tratamentos.

Em relação aos tratamentos que promoveram menor controle no crescimento micelial, estão o controle absoluto e o controle com leite para as duas linhagens; os óleos de eucalipto e orégano a 0,2% e 0,4% e o óleo de erva-cidreira a 0,2%, 0,4% e 0,8%, apenas para a linhagem LF.2.

Teixeira et al. (2013) verificaram que os óleos de tomilho, cravo-da-índia, canela, em concentrações mais elevadas, e o fungicida Maxim XL<sup>®</sup> inibiram completamente o crescimento micelial de *Stenocarpella maydis*, responsável pela podridão-do-colmo em milho. Similarmente, Viegas et al. (2005) observaram efeito inibitório do óleo de canela no crescimento micelial de isolados de *Aspergillus flavus*.

#### **4.2 Avaliação da germinação de conídios submetidos à exposição direta de óleos essenciais em diferentes concentrações**

Houve interação entre os fatores óleo essencial, concentração do óleo e linhagens do fungo *L. fungicola* para a variável Porcentagem de Germinação (PGERM) (ANEXO A) (Tabela 5). Foi aplicado o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para comparar as médias de PGERM dos óleos dentro da codificação concentração x linhagem.

Tabela 5 Desdobramento do fator óleo essencial dentro da codificação concentração x linhagem, para a variável Porcentagem de Germinação (PGERM) do fungo *Lecanicillium fungicola* em meio Ágar Água

		ÓLEOS					
CONC	LINH	CAN	CRA	ERVA	EUC	ORE	TOM
0,2%	1	0Aa	16Bb	40Ec	40Ed	34Db	24Cc
0,2%	2	0Aa	30Cc	20Ba	36Dc	46Ec	32Cc
0,4%	1	0Aa	0Aa	16Ba	34Cb	44Db	12Bb
0,4%	2	0Aa	0Aa	20Ba	34Cb	46Db	16Bb
0,8%	1	0Aa	0Aa	20Ba	30Cb	30Ca	0Aa
0,8%	2	0Aa	0Aa	30Cb	26Ba	32Ca	0Aa
1,6%	1	0Aa	0Aa	14Ba	18Ba	24Ca	0Aa
1,6%	2	0Aa	0Aa	10Ba	12Ba	26Ca	0Aa

CONC – Concentração dos óleos; LINH – Linhagem; CAN – óleo essencial de canela; CRA – óleo essencial de cravo; ERVA – óleo essencial de erva-cidreira; EUC – óleo essencial de eucalipto; ORE – óleo essencial de orégano; TOM – óleo essencial de tomilho. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os óleos essenciais influenciaram de maneira diferenciada a germinação de conídios de *L. fungicola*, quando comparados entre si, considerando-se as diferentes concentrações e linhagens. Observou-se que os óleos essenciais de cravo (0,4%, 0,8% e 1,6%) e tomilho (0,8% e 1,6%) inibiram totalmente a germinação de conídios das duas linhagens de *L. fungicola*; enquanto que o óleo essencial de canela inibiu a germinação de conídios em todas as concentrações para as duas linhagens.

Os tratamentos com os óleos de erva-cidreira, eucalipto e orégano proporcionaram redução no percentual de germinação de conídios, conforme maior a concentração do óleo essencial no meio de cultura. Entretanto, tais óleos não foram capazes de inibir totalmente a germinação.

Vale ressaltar que todos os tratamentos promoveram inibição superior a 50% de germinação de conídios de *L. fungicola*.



É possível observar o mesmo comportamento entre as linhagens nas concentrações 0,4%, 0,8% e 1,6%. Apenas na concentração 0,2%, nos tratamentos com os óleos de cravo, erva-cidreira, eucalipto e orégano, as médias de porcentagem de germinação diferiram entre si.

Os resultados obtidos neste experimento corroboram com os obtidos por alguns autores. Barrera-Necha et al. (2008) verificaram a eficiência dos óleos de *C. zeylanicum* e *S. aromaticum*, a 50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sobre a germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, com inibição superior a 98%. Teixeira et al. (2013) verificaram que os óleos de cravo, tomilho e canela inibiram totalmente a germinação dos conídios de *S. maydis* em todas as concentrações. Para o óleo de eucalipto, a germinação variou na faixa de 35,5% a 65,75%, o que mostra um desempenho intermediário deste óleo em relação aos outros tratamentos.

Contudo, Mitchell et al. (2010) apresentaram resultado diferente para o óleo de orégano, visto que este foi efetivo na inibição da germinação de esporos de fungos do gênero *Aspergillus* em um curto tempo de exposição. Os dados observados no trabalho de Tagami et al. (2009), apontam a atividade antifúngica do óleo *L. alba* sobre *A. alternata*, sendo a média de inibição de 24 % para a germinação de esporos.

O desdobramento do fator concentração de óleos essenciais dentro da codificação óleo x linhagem foi testada por análise de regressão (Figura 8). Considerando os parâmetros b ( $b_0$ ,  $b_1$  e  $b_2$ ) e o coeficiente de determinação ajustado da análise de regressão ( $R^2$ ), o modelo quadrático foi o que melhor se adequou para representar os dados de porcentagem de germinação de conídios sob influência dos óleos de cravo, erva-cidreira e tomilho para as linhagens LF.1 e LF.2, e orégano para a linhagem LF.2. Para os óleos de eucalipto para as linhagens LF.1 e LF.2 e orégano para a linhagem LF.1, o modelo que melhor representou os dados foi o linear.

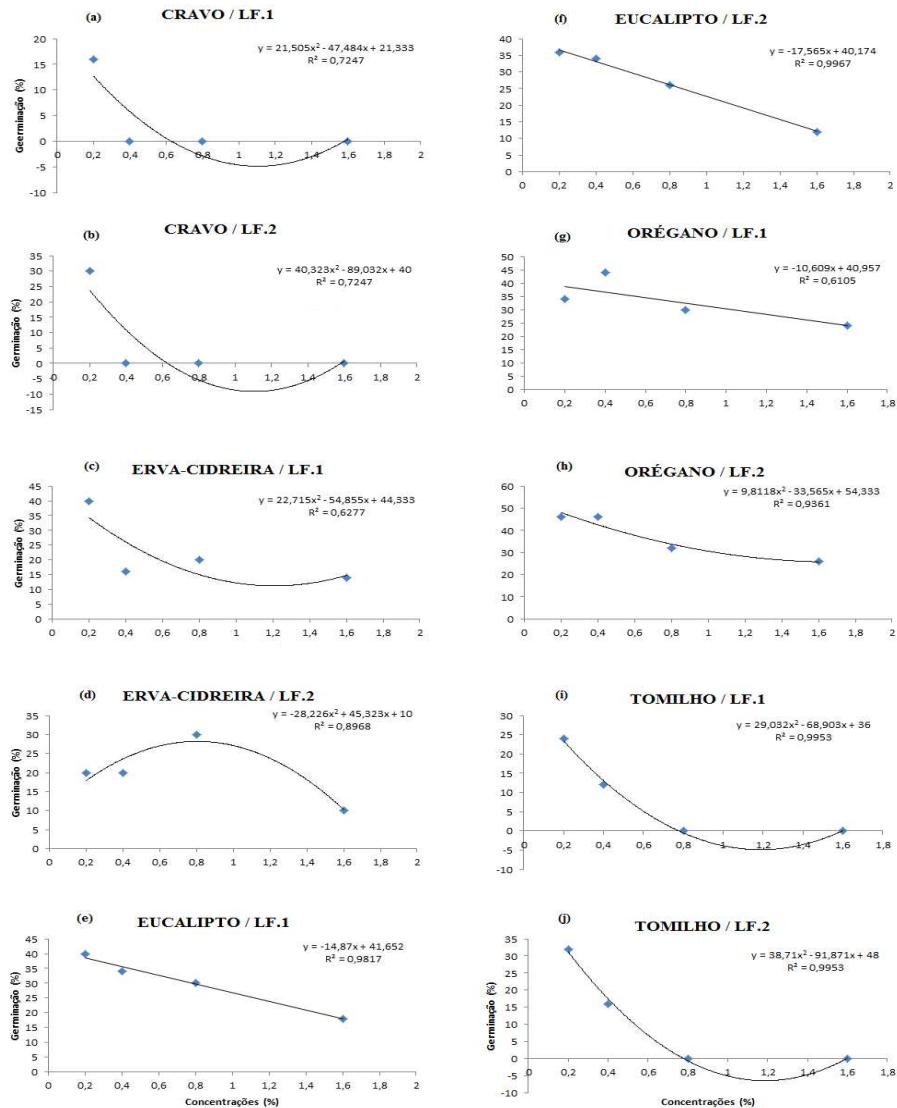


Figura 8 Porcentagem de Germinação (PGERM) do fungo *Lecanicillium fungicola* em meio Ágar Água acrescido de óleo essencial de cravo/LF.1 (a), óleo de cravo/LF.2 (b), óleo de erva-cidreira/LF.1 (c), óleo de erva-cidreira/LF.2 (d), óleo de eucalipto/LF.1 (e), óleo de eucalipto/LF.2 (f), óleo de orégano/LF.1 (g), óleo de orégano/LF.2 (h), óleo de tomilho/LF.1 (i) e óleo de tomilho/LF.2 (j)

Os resultados do tratamento com o óleo de canela não foram significativos ( $p>0,05$ ), ou seja, independente da concentração e da linhagem, este óleo inibiu a germinação de conídios em 100% em todos os tratamentos.

Os maiores valores de PGERM para a linhagem LF.1 foram observados na concentração 0,2% nos tratamentos com óleos de cravo (16%), erva-cidreira (40%), eucalipto (40%) e tomilho (24%). Porém, no tratamento com óleo de orégano o maior valor foi encontrado na concentração 0,4%, o qual foi de 44% de germinação. Para a linhagem LF.2, os maiores valores encontram-se nos tratamentos a 0,2% para o óleo de cravo (30%), eucalipto (36%), tomilho (32%). O óleo de orégano, contudo, apresentou o maior valor (46%) nas concentrações 0,2% e 0,4%, e o óleo de erva-cidreira na concentração de 0,8% com o valor de 30% de germinação.

De um modo geral, os óleos de erva-cidreira, eucalipto e orégano apresentaram um comportamento semelhante, ou seja, à medida em que as concentrações aumentavam, a porcentagem de germinação diminuía. Entretanto, tais tratamentos não foram capazes de inibir totalmente a germinação de conídios. Porém, nos tratamentos com os óleos de cravo a partir da concentração 0,4% e tomilho a 0,8% as duas linhagens tiveram a porcentagem de germinação inibidas em 100%. Logo, os tratamentos com os óleos de canela, cravo (0,4%) e tomilho (0,8%) foram os mais eficientes no controle da germinação de conídios de *L. fungicola*.

Tais resultados corroboram com outros trabalhos. Abreu (2006), utilizando o óleo essencial de canela, verificou redução total da germinação de *A. solani* a partir da concentração de  $750\mu\text{L L}^{-1}$ . Possivelmente, os compostos cinamaldeído e eugenol presentes no óleo de canela são os responsáveis por tal inibição, por apresentarem propriedades antimicrobianas já comprovadas (MONTES-BELMONT; CARVAJAL, 1998).

Pereira et al. (2008) observaram a redução da germinação de conídios de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke, quando submetidos a concentrações crescentes do óleo essencial de tomilho. Segundo Zambonelli et al. (1996), tal efeito, provavelmente, deve-se à presença dos compostos timol e carvacrol no óleo de tomilho, os quais apresentam propriedade bactericida e fungicida (PINTO; LAMEIRA; SANTIAGO, 2001).

No trabalho de Roswalka (2010), o óleo de cravo não apresentou capacidade de inibir totalmente a germinação dos conídios de *C. gloeosporioides*, porém, foi observado o maior número de conídios não germinados. Neste caso, a toxidez do óleo sobre o patógeno é atribuída ao composto eugenol presente em grande concentração no óleo de cravo-da-índia que, segundo Bullerman, Liew e Seier (1977) e Vieira et al. (2004), são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas.

O último desdobramento da interação tripla da variável PGERM foram as linhagens dentro da codificação óleo x concentração (ANEXO A). Na tabela 6 estão apresentadas as médias de PGERM. Para os tratamentos com os óleos de canela e cravo (0,4%, 0,8% e 1,6%), erva-cidreira (0,4% e 1,6%), eucalipto (0,2%, 0,4% e 0,8%), orégano (0,4%, 0,8% e 1,6%) e tomilho (0,4%, 0,8% e 1,6%), as médias de porcentagem de germinação para ambas as linhagens foram estatisticamente iguais. Portanto, as linhagens responderam da mesma maneira a estes tratamentos.

Tabela 6 Desdobramento do fator linhagem (LF.1 e LF.2) dentro da codificação óleo x concentração, para a variável Porcentagem de Germinação (PGERM) do fungo *Lecanicillium fungicola* em meio Ágar Água

ÓLEO / CONCENTRAÇÃO	LINHAGENS*	
	LF.1	LF.2
CANELA 0,2%	0A	0A
CANELA 0,4%	0A	0A
CANELA 0,8%	0A	0A
CANELA 1,6%	0A	0A
CRAVO 0,2%	16A	30B
CRAVO 0,4%	0A	0A
CRAVO 0,8%	0A	0A
CRAVO 1,6%	0A	0A
ERVA-CIDREIRA 0,2%	40B	20A
ERVA-CIDREIRA 0,4%	16A	20A
ERVA-CIDREIRA 0,8%	20A	30B
ERVA-CIDREIRA 1,6%	14A	10A
EUCALIPTO 0,2%	40A	36A
EUCALIPTO 0,4%	34A	34A
EUCALIPTO 0,8%	30A	26A
EUCALIPTO 1,6%	18B	12A
ORÉGANO 0,2%	34A	46B
ORÉGANO 0,4%	44A	46A
ORÉGANO 0,8%	30A	32A
ORÉGANO 1,6%	24A	26A
TOMILHO 0,2%	24A	32B
TOMILHO 0,4%	12A	16A
TOMILHO 0,8%	0A	0A
TOMILHO 1,6%	0A	0A

\* Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

No entanto, para os tratamentos com os óleos de cravo (0,2%), erva-cidreira (0,2% e 0,8%), eucalipto (1,6%), orégano (0,2%) e tomilho (0,2%),

houve diferença entre as médias das duas linhagens. Desta forma, as linhagens LF.1 e LF.2 apresentaram comportamentos diferentes frente a estes tratamentos.

Portanto, o óleo de canela foi o melhor tratamento para as duas linhagens, pois inibiu em 100% a germinação de conídios, em todas as concentrações, seguido do óleo de cravo e de tomilho, os quais inibiram em 100% a germinação a partir da concentração 0,4% e 0,8%, respectivamente. Porém, os óleos de eucalipto, orégano e erva-cidreira foram os menos eficientes, visto que estes reduziram, mas não foram capazes de inibir totalmente a taxa de germinação.

Posteriormente, foi realizada a análise de variância entre os tratamentos com os óleos, as testemunhas (Ágar Água e Ágar Água + solução de leite em pó) e o fungicida, para a variável PGERM, a qual foi significativa ( $p < 0,05$ ) (ANEXO A). Desta maneira, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Figura 9).

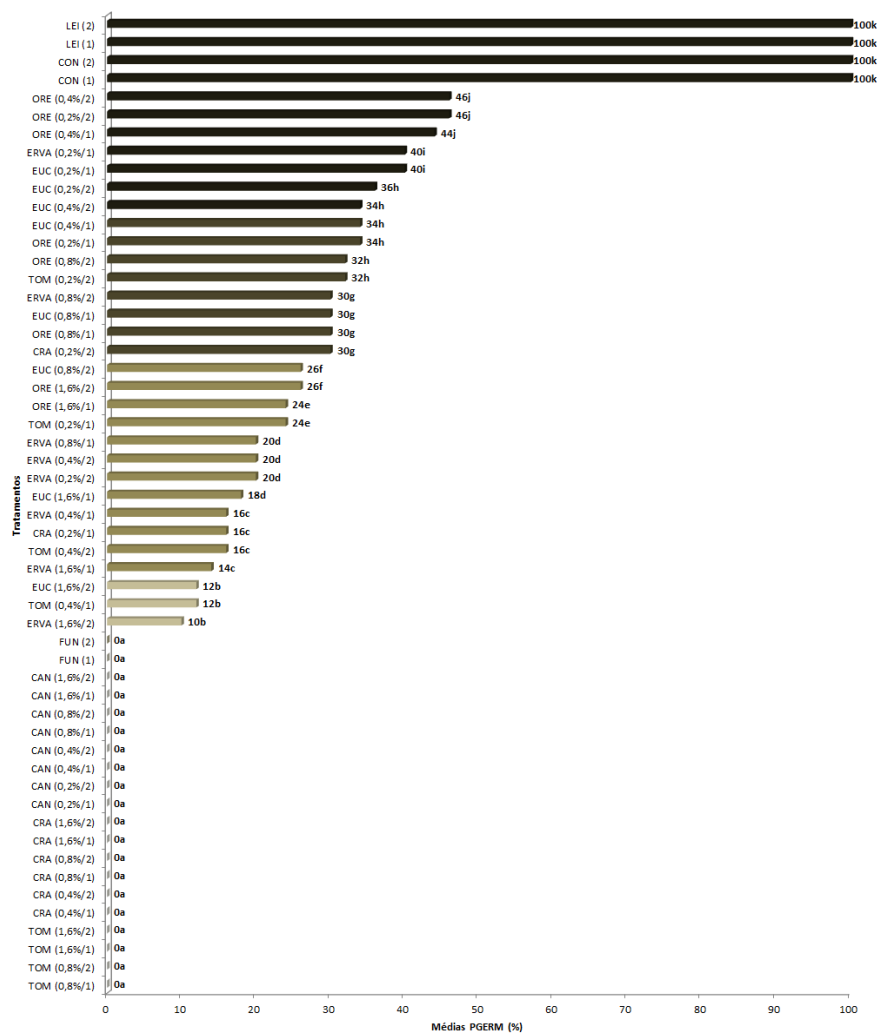


Figura 9 Médias dos tratamentos para a variável Porcentagem de Germinação (PGERM) do fungo *Lecanicillium fungicola* em meio Ágar Água. TOM – óleo essencial de tomilho; CRA – óleo essencial de cravo; CAN – óleo essencial de canela; FUN – fungicida Sportak; EUC – óleo essencial de eucalipto; ERVA – óleo essencial de erva-cidreira; ORE – óleo essencial de orégano; CON – controle absoluto; LEI – controle com leite; 1 – linhagem LF.1; 2 – linhagem LF.2

Nota: Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os tratamentos com o fungicida Sportak, os óleos de canela (0,2%, 0,4%, 0,8% e 1,6%), cravo (0,4%, 0,8% e 1,6%) e tomilho (0,8% e 1,6%), apresentaram 100% de inibição de germinação para as duas linhagens. No entanto, houve um aumento da porcentagem de germinação por parte dos demais tratamentos.

Em relação aos tratamentos que promoveram menor controle na germinação de conídios estão os controles absolutos e os controles com leite para as duas linhagens; o óleo de orégano a 0,4% para as duas linhagens e 0,2%, apenas para a linhagem LF.2.

Teixeira et al. (2013) verificaram que a germinação de *S. maydis* foi reduzida pelos óleos de tomilho, cravo-da-índia e canela. Além disso, o óleo de eucalipto, comparado com o controle, produziu um efeito intermediário na germinação de conídios.

Portanto, com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se o potencial de alguns óleos no possível controle da doença bolha-seca, porém, estudos mais aprofundados devem ser conduzidos para que se possa conhecer melhor o modo de ação destes.

#### **4.3 Estudo da interação entre o patógeno *L. fungicola* e o hospedeiro *A. bisporus* por microscopia eletrônica de varredura**

Na microscopia eletrônica de varredura, as hifas de *L. fungicola* foram facilmente distinguidas das hifas de *A. bisporus*, devido ao seu menor diâmetro (Figura 10), do mesmo modo como foi relatado por Calonje et al. (2000). Além disso, observou-se que, conforme o maior tempo de coleta das amostras, maior a quantidade de esporos de *L. fungicola* e maior a ocorrência de germinação. A figura 11 (a) mostra o tempo de 13 horas após a inoculação, é possível observar a presença de poucos esporos. A figura 11 (b), representa o tempo de 16 horas,



onde há um aumento do número de esporos e pouca germinação. Na figura 11 (c), 19 horas após a inoculação, observa-se um crescimento na germinação dos esporos. Enquanto a figura 11 (d), tempo de 23 horas, é possível, a observação de aglomerados de esporos de *L. fungicola* (tamanho do esporo 3.8–7.2 x 1.2–2.4  $\mu\text{m}$ ; FLETCHER; GAZE, 2008) e em sua maioria germinando.

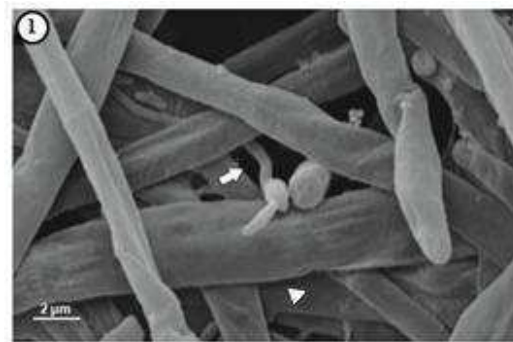


Figura 10 Eletromicrografia de varredura das hifas de *L. fungicola* e de *A. bisporus*, a fim de indicar a diferença de tamanho entre as hifas

Nota: Seta indica *L. fungicola* e cabeça de seta *A. bisporus*.

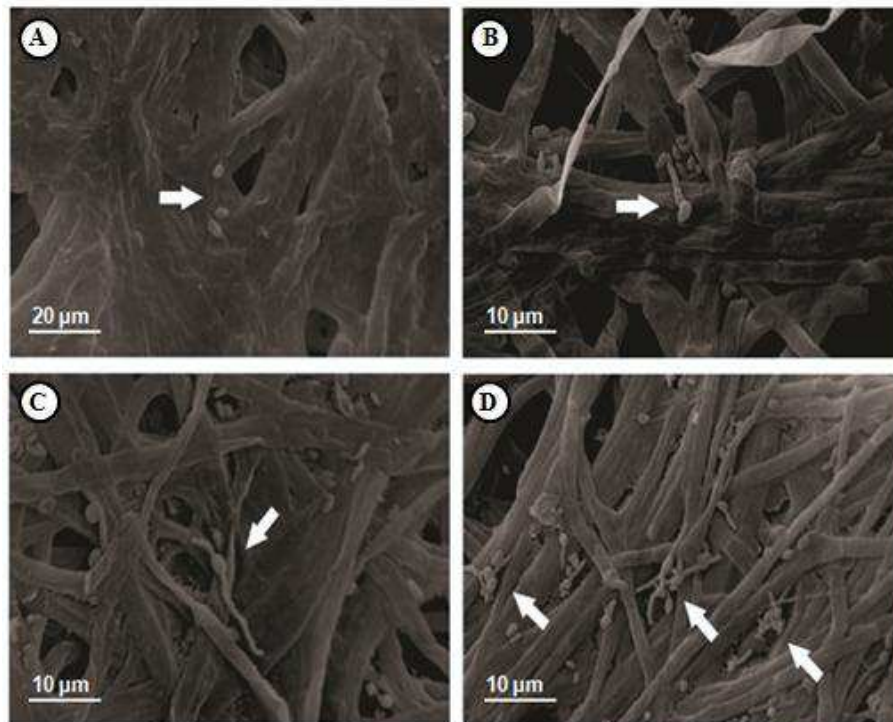


Figura 11 Eletromicrografia de Varredura de *A. bisporus* inoculado com *L. fungicola*. Tempos de coleta das amostras após a inoculação. (A) 13 horas, (B) 16 horas, (C) 19 horas e (D) 23 horas

Através das micrografias não foi possível a visualização de estruturas de penetração especializadas, ou qualquer evidência de penetração direta do patógeno no tecido do hospedeiro. Tais resultados foram relatados por Shamshad, Clift e Mansfield (2009). Entretanto, diferenciam-se dos resultados de North e Wuest (1993) e Dragt et al. (1996), os quais mostraram evidências de penetração direta e estruturas de penetração especializadas de *L. fungicola* nas paredes das células de *A. bisporus* usando a microscopia eletrônica de transmissão (MET). A diferença dos resultados pode ter sido devido às diferentes técnicas de microscopia eletrônica utilizadas.

## 5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de cravo e canela na concentração 0,4% e o óleo de tomilho a 0,8% são eficientes no controle *in vitro* de *L. fungicola*, mas os óleos essenciais de erva-cidreira, eucalipto e orégano não são eficientes.

Contudo, o uso de óleos essenciais constitui uma ferramenta promissora como alternativa ao uso de fungicidas sintéticos, embora a relação custo-eficácia de aplicação deva ser considerada, o que justifica a necessidade de mais pesquisas sobre o uso prático de óleos essenciais para o controle de *L. fungicola*.

Embora não tenha sido possível visualizar as estruturas de penetração de *L. fungicola* em *A. Bisporus*, através da MEV, os resultados demonstraram que com o passar das horas há um crescimento do patógeno, sugerindo a ocorrência da infecção com aproximadamente 19 horas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 71 p. Tese (Doutorado em Agronomia-Horticultura) – Faculdade Paulista de Ciências Agrárias, Botucatu, 2006.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALVES, E. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de transmissão**. Lavras: Editora da UFLA, 2004.
- ALVES, E.; LEITE, B.; KITAJIMA, E. W. Ultra-estrutura na era do DNA. In: PASCHOLATI, S. F. et al. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular: volume 13**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 433-466.
- AQUINO, C. F. et al. Composição química e atividade *in vitro* de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 329-336, jan. 2014.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: Edufes, 2008.
- BARRERA-NECHA, L. L. et al. 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 Journal**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 174-178, Mar. 2008.
- BERENDSEN, R. L. et al. Absence of induced resistance in *Agaricus bisporus* against *Lecanicillium fungicola*. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Essex, v. 103, n. 3, p. 539–550, Mar. 2013.
- BERENDSEN, R. L. et al. Effects of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from mushroom cultures on *Lecanicillium fungicola*. **Biological Control**, Orlando, v. 63, n. 2, p. 210–221, Nov. 2012.

BERENDSEN, R. L. et al. *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 5, p. 585–595, Sept. 2010.

BERNARDO, D. et al. *Verticillium* disease or “dry bubble” of cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* cell wall gluco galactomannan. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 9, p. 729–735, Sept. 2004.

BICALHO, A. C. et al. **Importância dos cogumelos (pertencentes ao Filo Basidiomycota) para o homem e sua distribuição nos diversos biomas do Brasil**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013. (Relatório de Disciplina).

BONONI, V. L. R. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1999.

BONONI, V. L. R. O cultivo de *Agaricus bisporus* no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS, ALIMENTAÇÃO, SAÚDE, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE NO BRASIL, 1., 2003, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2003. p. 24-31.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett, 1999.

BRADY, B. L. K.; GIBSON, I. A. S. *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, Inglaterra, n. 498, p. 2, 1976.

BRADY, B. L. K.; WALKER, J. M. *Verticillium psalliotae* Treschow. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, Inglaterra, n. 497, p. 2, 1976.

BULLERMAN, L. B.; LIEW, F. Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 6, n. 42, p. 1107-1109, nov./dez. 1977.

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

CALONJE, M. et al. Enzyme activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. **Microbiology**, Oxford, v. 143, n. 9, p. 2999–3006, Sept. 1997.

CALONJE, M. et al. Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 8, p. 988–992, Aug. 2000.

CAPELARI, M.; GUGLIOTTA, A. M.; FIGUEIREDO, M. B. O estudo de fungos macroscópicos no estado de São Paulo. IN: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. **Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do 1º século XX, 2: fungos macroscópicos e plantas**. São Paulo: FAPESP, 1998. p. 1-79.

CARDOSO, M. G. et al. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal: volume 1**. Lavras: Editora da UFLA, 2001.

CHALFOUN, S. M. et al. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 856-862, jul./ago. 2004.

CHOUDHARY, D. K. First preliminary report on isolation and characterization of novel *Acinetobacter* spp. in casing soil used for cultivation of button mushroom, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. **International Journal of Microbiology**, Oxford, v. 2011, p. 6-11, Oct. 2011.

COLLINS, S. et al. Advantages of environmental scanning electron microscopy in studies of microorganisms. **Microscopy Research and Technology**, Oxford, v. 25, n. 5-6, p. 398-408, Aug. 1993.

CONNER, D. E. Naturally occurring compounds. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEM, A. L. (Ed.). **Antimicrobials and foods**. New York: CRC Press, 1993. p. 441-468.

CONSTANTIN, J.; DUFOUR, I. Recherches sur la môle, maladie du champignon de couche. **Revue Générale de Botanique**, Paris, v. 4, p. 401-406, 1892.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Ottawa: John Wiley, 2002.

DHIMA, K. et al. Competitiveness and essential oil phytotoxicity of seven annual aromatic plants. **Weed Science**, Champaign, v. 58, n. 4, p. 457-465, Oct./Dec. 2010.

DRAGT, J. W. et al. Intracellular infection of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 4, p. 1082–1086, Oct./Dec. 1996.

EKANEM, E. O.; UBENGAMA, V. S. Chemical composition, anti-nutritional factors and shelf-life of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 39, n. 6, p. 635-638, 2002.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do sisvar para windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

FLETCHER, J. T.; GAZE, R. H. **Mushroom pest and disease control**. San Diego: Academic Press, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 05 dez. 2014.

FUNGOS: características e importâncias. **Ambiente Brasil**, Paraná, 2014. Disponível em: <[http://ambientes.ambientebrasil.com.br/biotecnologia/artigos\\_de\\_biotecnologia/fungos:\\_caracteristicas\\_e\\_importancias.html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/biotecnologia/artigos_de_biotecnologia/fungos:_caracteristicas_e_importancias.html)>. Acesso em: 12 dez. 2014.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista Do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 149-154, set. 2005.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 154-157, jan./mar. 2007.

GEA, F. J.; NAVARRO, M. J.; TELLO, J. C. Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese in vitro. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 741–745, June 2005.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.

GONZALEZ-FANDOS, E. et al. Effect of packaging conditions on the growth of micro-organisms and the quality characteristics of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored at inadequate temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 4, p. 624-632, Oct. 2000.

GROSSO, C. et al. Herbicidal activity of volatiles from coriander, winter savory, cotton lavender, and thyme isolated by hydrodistillation and supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 20, p. 11007-11013, Oct. 2010.

GUIMARÃES, L. G. de L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, ago. 2008.

HAWKSWORTH, D. L. **Magnitude and distribution of biodiversity**. In: HEYWOOD, V. H. Global biodiversity assessment. Cambridge:Cambridge University Pressm, 1995. p. 107-191.

HELM, C.; CORADIN, J.; KESTRING, D. **Avaliação da composição química do cogumelos comestíveis *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus portobello*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus***. Colombo: Embrapa Florestas, 2009. p. 1517-5030.

HERRERA, O. M. **Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Agaricus blazei*: um enfoque de cadeia produtiva**. 2001. 200 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2001.

IACOMINI, M. Polissacarídeos presentes em cogumelos comestíveis: aplicações e valores nutricionais. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRAZIL, 4., 2008, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: SICOG, 2008. p. 46.

ITAKO, A. T. et al. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 241,244, May/June 2008.



KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 5, n. 2, p. 120-132, May/Aug. 2010.

LARGETEAU, M. L.; REGNAULT-ROGER, C.; SAVOIE, J. M. *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*: variations in host contribution to total fungal DNA in relation to symptom heterogeneity. **European Journal Plant Pathology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 155–164, June 2007.

LARGETEAU, M.; SAVOIE, J. M. Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 63–73, Mar. 2010.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 187-195, Aug. 2001.

MARTINS, F. X. **Cogumelos**: património natural transmontano. Lisboa: Editora João Azevedo, 2004.

MITCHELL, T. C. et al. *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially oxigenic *Aspergilli*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 755-760, jul./set. 2010.

MODA, E. M. et al. Uso de peróxido de hidrogênio e ácido cítrico na conservação de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 291-296, abr./jun. 2005.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their componentes. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 5, p. 616-619, May 1998.

NORTH, L. H.; WUEST, P. J. The infection process and symptom expression of *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 15, p. 74–80, 1993.

NOVAES, M. R. C. G.; NOVAES, L. C. G. Fármaco-nutrientes em cogumelos comestíveis Agaricales e outros basidiomicetos. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 181-187, 2005.

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

OOTANI, M. A. et al. Toxicidade de óleos essenciais de eucalipto e citronela sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 4, p. 609-618, July/Aug. 2011.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

PARK, I. K. et al. Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pinpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, n. 8, p. 723-728, Aug. 2006.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, Oct. 2008.

PERINI, V. B. M. et al. Effect of vegetal extract in the inhibition of mycelial growth of *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 4, n. 1, p. 70-77, Feb. 2013.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. L.; SANTIAGO, E. J. A.; SILVA, F. G. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Lavras: Editora da UFLA, p. 222, 2001.

PIPER, P. et al. We akacid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, Amsterdam, v. 147, n. 10, p. 2635-2642, Oct. 2001.

RAI, D. R.; PAUL, S. Transient state in-pack respiration rates of mushroom under modified atmosphere packaging based on enzyme kinetics. **Biosystems Engineering**, London, v. 98, n. 3, p. 319-326, Nov. 2007.

REGNIER, T.; COMBRINCK, S. *In vitro* and *in vivo* screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 76, n. 4, p. 681-685, Oct. 2010.

RIGONI, D.; CORADIN, J. H.; ROSSO, M. L. Avaliação da composição química de cogumelos comestíveis comercializadas na região de Curitiba/PR. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRAZIL, 4., 2008, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: SICOG, 2008. p. 142.

ROSWALKA, 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. 180 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, 2010.

SAMPAIO, S. M.; QUEIROZ, M. R. Influência do processo de secagem na qualidade do cogumelo shiitake. **Revista Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 570-577, maio/ago. 2006.

SANCHEZ, C. Mini review: modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 6, p. 756-762, June 2004.

SATISH, S. et al. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. **Journal of Agricultural Technology**, Elmsford, v. 3, n. 1, p. 109-119, May 2007.

SESLI, E.; TUZEN, M. Micro and macroelement contents of edible wild growing Mushrooms in Artvin Province of Turkey. **Journal of Chemistry**, London, v. 18, n. 2, p. 1423-1429, 2006.

SHAMSHAD, A.; CLIFTA, B. A. D.; MANSFIELD, S. Host-parasite interaction between cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* hybrid strain Sylvan A15, and the mycoparasite *Verticillium fungicola*, a causal agent of dry bubble disease. **Australasian Plant Pathology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 74-78, Jan. 2009.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. de; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

SILVA, M. R. C. **Substâncias bioativas de fungos basidiomicetos.** 2007. 46 p. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2007.

SIMPÓSIO sobre cogumelos busca viabilizar comercialização. **Portal Brasil**, Brasília, 2006. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2013/10/simposio-sobre-cogumelos-busca-viabilizar-comercializacao>> Acesso em: 19 dez. 2014.

SOARES, A. et al. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 341-350, abr./jun. 2011.

SOUZA, S. M. C. et al. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, maio/jun. 2004.

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, Den Hague, v. 161, n. 2, p. 119-128, Feb. 2006.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Campinas, v. 11, p. 16-21, 1999.

TAGAMI, O. K. et al. Fungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 285-294, abr./jun. 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TANOVIĆ, B. et al. *In vitro* effect of essential oils from aromatic and medicinal plants on mushroom pathogens: *Verticillium fungicola* var *fungicola*, *Mycogone perniciosa*, and *Cladobotryum* sp. **Archives of Biological Sciences**, Belgrade, v. 61, n. 2, p. 231-237, Apr. 2009.

TAVEIRA, V. C.; NOVAES, M. R. C. G. Consumption of mushrooms in human nutrition: a review of literature. **Comunicação em Ciências da Saúde**, Brasília, v. 18, n. 4, p. 315-322, Oct./Dec. 2007.

TEIXEIRA, G. A. et al. Essential oils on the control of stem and ear rot in maize. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 11, p. 1945-1951, nov. 2013.

URBEN, A. F.; SIQUEIRA, P. **Cogumelo e suas delícias**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

VAN WETTER, M.; WÖSTEN, H. A. B.; WESSELS, J. G. H. SC3 and SC4 hydrophobins have distinct roles in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 36, n. 1, p. 201–210, Apr. 2000.

VEIHMEYER, F. J. **The mycogone disease of mushrooms and its control**. New York: Department of Agriculture, 1914.

VIEGAS, E. C. et al. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 915-919, out./dez. 2005.

VIEIRA, T. R. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 536-539, May 2004.

WARE, W. M. A disease of cultivated mushrooms caused by *Verticillium malthousei* sp. **Annals of Botany**, London, v. 47, n. 4, p. 763-785, Nov. 1933.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Journal of Phytopathology**, London, v. 144, n. 9-10, p. 491-494, Nov. 1996.

ZARE, R.; GAMS, W. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, n. 7, p. 811–824, July 2008.

**ANEXOS****ANEXO A - Lista de tabelas das análises estatísticas**

		<b>Página</b>
TABELA 1A	Resumo da análise de variância da interação tripla (óleo x concentração x linhagem) para a variável IVCM	71
TABELA 2A	Resumo da análise de variância da interação óleo x concentração para a variável IVCM	72
TABELA 3A	Resumo da análise de variância da interação óleo x linhagem para a variável IVCM	73
TABELA 4A	Resumo da análise de variância da comparação entre os tratamentos constituídos por óleos essenciais, as testemunhas (BDA e BDA + solução de leite em pó) e o fungicida Sportak, para a variável IVCM	74
TABELA 5A	Resumo da análise de variância da interação tripla (óleo x concentração x linhagem) para a variável PGERM	75
TABELA 6A	Resumo da análise de variância do desdobramento do fator óleo dentro da codificação concentração x linhagem para a variável PGERM	76

		70
TABELA 7A	Resumo da análise de variância do desdobramento do fator concentração de óleos essenciais dentro da codificação óleo x linhagem para a variável PGERM	77
TABELA 8A	Resumo da análise de variância do desdobramento do fator linhagem dentro da codificação óleo x concentração para a variável PGERM	78
TABELA 9A	Resumo da análise de variância da comparação entre os tratamentos constituídos por óleos essenciais, as testemunhas (Ágar Água e Ágar Água + solução de leite em pó) e o fungicida Sportak, para a variável PGERM	79

TABELA 1A Resumo da análise de variância da interação tripla (óleo x concentração x linhagem) para a variável IVCM

Variável analisada: IVCM

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
OLEO	5	1023.296917	204.659383	455.321	0.0000
CONCENT	3	392.976847	130.992282	291.429	0.0000
LINHAG	1	28.836900	28.836900	64.156	0.0000
OLEO*CONCENT	15	243.965511	16.264367	36.185	0.0000
OLEO*LINHAG	5	19.460742	3.892148	8.659	0.0000
CONCENT*LINHAG	3	0.621683	0.207228	0.461	0.7101
OLEO*CONCENT*LINHAG	15	11.735575	0.782372	1.741	0.0555
erro	96	43.150400	0.449483		
Total corrigido	143	1764.044575			
CV (%) =	14.70				
Média geral:	4.5620833		Número de observações:	144	



TABELA 2A Resumo da análise de variância da interação óleo x concentração para a variável IVC

-----  
 Análise do desdobramento de CONCENT dentro de cada nível de:  
 OLEO  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONCENT	/1 3	177.096200	59.032067	131.333	0.0000
CONCENT	/2 3	111.900800	37.300267	82.985	0.0000
CONCENT	/3 3	17.938350	5.979450	13.303	0.0000
CONCENT	/4 3	71.605213	23.868404	53.102	0.0000
CONCENT	/5 3	12.017683	4.005894	8.912	0.0000
CONCENT	/6 3	246.384112	82.128037	182.717	0.0000
Erro	96	43.150400	0.449483		

Codificação usada para o desdobramento

cod. OLEO  
 1 = CANELA  
 2 = CRAVO  
 3 = ERVA  
 4 = EUCALIP  
 5 = OREGANO  
 6 = TOMILHO

TABELA 3A Resumo da análise de variância da interação óleo x linhagem para a variável IVCM

-----  
 Análise do desdobramento de LINHAG dentro de cada nível de:

OLEO  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
LINHAG	/1 1	0.228150	0.228150	0.508	0.4779
LINHAG	/2 1	1.696017	1.696017	3.773	0.0550
LINHAG	/3 1	17.306017	17.306017	38.502	0.0000
LINHAG	/4 1	23.463038	23.463038	52.200	0.0000
LINHAG	/5 1	3.450417	3.450417	7.676	0.0067
LINHAG	/6 1	2.154004	2.154004	4.792	0.0310
Erro	96	43.150400	0.449483		

Codificação usada para o desdobramento

cod. OLEO

- 1 = CANELA
- 2 = CRAVO
- 3 = ERVA
- 4 = EUCALIP
- 5 = OREGANO
- 6 = TOMILHO

TABELA 4A Resumo da análise de variância da comparação entre os tratamentos constituídos por óleos essenciais, as testemunhas (BDA e BDA + solução de leite em pó) e o fungicida Sportak, para a variável IVCM

-----  
 Variável analisada: IVCM

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	53	2069.950123	39.055663	94.957	0.0000
erro	108	44.420000	0.411296		
Total corrigido	161	2114.370123			
CV (%) =	13.61				
Média geral:	4.7135802	Número de observações:	162		

TABELA 5A Resumo da análise de variância da interação tripla (óleo x concentração x linhagem) para a variável PGERM

-----  
 Variável analisada: PGERM

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
OLEO	5	22727.000000	4545.400000	545.448	0.0000
CONCENT	3	6153.000000	2051.000000	246.120	0.0000
LINHAG	1	25.000000	25.000000	3.000	0.0865
OLEO*CONCENT	15	3843.000000	256.200000	30.744	0.0000
OLEO*LINHAG	5	335.000000	67.000000	8.040	0.0000
CONCENT*LINHAG	3	57.000000	19.000000	2.280	0.0842
OLEO*CONCENT*LINHAG	15	1131.000000	75.400000	9.048	0.0000
erro	96	800.000000	8.333333		
Total corrigido	143	35071.000000			
CV (%) =	17.06				
Média geral:	16.9166667	Número de observações:	144		

TABELA 6A Resumo da análise de variância do desdobramento do fator óleo dentro da codificação concentração x linhagem para a variável PGERM

-----  
 Análise do desdobramento de OLEO dentro de cada nível de:

CONCENT LINHAG  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
OLEO	/1	5	3706.000000	741.200000	88.944	0.0000
OLEO	/2	5	3760.000000	752.000000	90.240	0.0000
OLEO	/3	5	4858.000000	971.600000	116.592	0.0000
OLEO	/4	5	5056.000000	1011.200000	121.344	0.0000
OLEO	/5	5	3400.000000	680.000000	81.600	0.0000
OLEO	/6	5	3928.000000	785.600000	94.272	0.0000
OLEO	/7	5	1720.000000	344.000000	41.280	0.0000
OLEO	/8	5	1608.000000	321.600000	38.592	0.0000
Erro		96	800.000000	8.333333		

Codificação usada para o desdobramento

cod. CONCENT LINHAG

1 = 0,2 1

2 = 0,2 2

3 = 0,4 1

4 = 0,4 2

5 = 0,8 1

6 = 0,8 2

7 = 1,6 1

8 = 1,6 2

TABELA 7A Resumo da análise de variância do desdobramento do fator concentração de óleos essenciais dentro da codificação óleo x linhagem para a variável PGERM

-----  
 Análise do desdobramento de CONCENT dentro de cada nível de:

OLEO LINHAG  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONCENT	/1 3	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
CONCENT	/2 3	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
CONCENT	/3 3	576.000000	192.000000	23.040	0.0000
CONCENT	/4 3	2025.000000	675.000000	81.000	0.0000
CONCENT	/5 3	1281.000000	427.000000	51.240	0.0000
CONCENT	/6 3	600.000000	200.000000	24.000	0.0000
CONCENT	/7 3	777.000000	259.000000	31.080	0.0000
CONCENT	/8 3	1068.000000	356.000000	42.720	0.0000
CONCENT	/9 3	636.000000	212.000000	25.440	0.0000
CONCENT	/10 3	921.000000	307.000000	36.840	0.0000
CONCENT	/11 3	1188.000000	396.000000	47.520	0.0000
CONCENT	/12 3	2112.000000	704.000000	84.480	0.0000
Erro	96	800.000000	8.333333		

-----  
 Codificação usada para o desdobramento

cod. OLEO LINHAG

- 1 = CANELA 1
- 2 = CANELA 2
- 3 = CRAVO 1
- 4 = CRAVO 2
- 5 = ERVA 1
- 6 = ERVA 2
- 7 = EUCALIP 1
- 8 = EUCALIP 2
- 9 = OREGANO 1
- 10 = OREGANO 2
- 11 = TOMILHO 1
- 12 = TOMILHO 2

TABELA 8A Resumo da análise de variância do desdobramento do fator linhagem dentro da codificação óleo x concentração para a variável PGERM

-----  
 Análise do desdobramento de LINHAG dentro de cada nível de:

OLEO CONCENT  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
LINHAG	/1 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
LINHAG	/2 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
LINHAG	/3 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
LINHAG	/4 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
LINHAG	/5 1	294.000000	294.000000	35.280	0.0000
LINHAG	/6 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
LINHAG	/7 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
LINHAG	/8 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
LINHAG	/9 1	600.000000	600.000000	72.000	0.0000
LINHAG	/10 1	24.000000	24.000000	2.880	0.0929
LINHAG	/11 1	150.000000	150.000000	18.000	0.0001
LINHAG	/12 1	24.000000	24.000000	2.880	0.0929
LINHAG	/13 1	24.000000	24.000000	2.880	0.0929
LINHAG	/14 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
LINHAG	/15 1	24.000000	24.000000	2.880	0.0929
LINHAG	/16 1	54.000000	54.000000	6.480	0.0125
LINHAG	/17 1	216.000000	216.000000	25.920	0.0000
LINHAG	/18 1	6.000000	6.000000	0.720	0.3983
LINHAG	/19 1	6.000000	6.000000	0.720	0.3983
LINHAG	/20 1	6.000000	6.000000	0.720	0.3983
LINHAG	/21 1	96.000000	96.000000	11.520	0.0010
LINHAG	/22 1	24.000000	24.000000	2.880	0.0929
LINHAG	/23 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
LINHAG	/24 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Erro	96	800.000000	8.333333		

Codificação usada para o desdobramento

cod. OLEO CONCENT

1 = CANELA 0,2	7 = CRAVO 0,8	13 = EUCALIP 0,2	19 = OREGANO 0,8
2 = CANELA 0,4	8 = CRAVO 1,6	14 = EUCALIP 0,4	20 = OREGANO 1,6
3 = CANELA 0,8	9 = ERVA 0,2	15 = EUCALIP 0,8	21 = TOMILHO 0,2
4 = CANELA 1,6	10 = ERVA 0,4	16 = EUCALIP 1,6	22 = TOMILHO 0,4
5 = CRAVO 0,2	11 = ERVA 0,8	17 = OREGANO 0,2	23 = TOMILHO 0,8
6 = CRAVO 0,4	12 = ERVA 1,6	18 = OREGANO 0,4	24 = TOMILHO 1,6

TABELA 9A Resumo da análise de variância da comparação entre os tratamentos constituídos por óleos essenciais, as testemunhas (Ágar Água e Ágar Água + solução de leite em pó) e o fungicida Sportak, para a variável PGERM

-----  
 Variável analisada: PGERM

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	53	113872.000000	2148.528302	290.051	0.0000
erro	108	800.000000	7.407407		
Total corrigido	161	114672.000000			
CV (%) =	12.13				
Média geral:	22.4444444	Número de observações:	162		