



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
CURSO DE AGRONOMIA

LETÍCIA RODRIGUES

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES E
PLÂNTULAS DE GIRASSOL ORNAMENTAL**

ERECHIM

2022

LETÍCIA RODRIGUES

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES E
PLÂNTULAS DE GIRASSOL ORNAMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Me. Daiani Brandler

ERECHIM

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Rodrigues, Leticia
CONTROLE BIOLÓGICO DE Sclerotinia sclerotiorum EM
SEMENTES E PLÂNTULAS DE GIRASSOL ORNAMENTAL / Leticia
Rodrigues. -- 2022.
31 f.:il.

Orientadora: Mestre Daiani Brandler

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Erechim,RS, 2022.

I. Brandler, Daiani, orient. II. Universidade Federal
da Fronteira Sul. III. Título.

LETÍCIA RODRIGUES

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES E
PLÂNTULAS DE GIRASSOL ORNAMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – campus Erechim, como parte das exigências para obtenção do grau de bacharel em Agronomia.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 15/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Me. Daiani Brandler – UFFS

Orientadora

Prof^ª. Dra. Paola Mendes Milanesi – UFFS

Avaliadora

Prof^ª. Dra. Sandra Maria Maziero – UFFS

Avaliadora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1	TESTE <i>IN VITRO</i>	10
2.2	TESTE <i>IN VIVO</i>	12
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1	TESTE <i>IN VITRO</i> – ÓLEOS ESSENCIAIS E CRESCIMENTO MICELIAL	14
3.2	TESTE <i>IN VITRO</i> – ANTAGONISMO DE <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> E <i>BACILLUS SUBTILIS</i> NO CONTROLE DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	18
3.3	TESTE <i>IN VIVO</i> – EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> EM PLÂNTULAS DE GIRASSOL ORNAMENTAL.....	20
4	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28
	ANEXOS	31

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE GIRASSOL ORNAMENTAL

Resumo: O girassol (*Helianthus annuus* L.) é hoje cultivado mundialmente, e entre os fatores bióticos que causam perdas de produção podemos destacar a ocorrência de *Sclerotinia sclerotiorum* que é um patógeno destrutivo de várias culturas economicamente importantes e de difícil controle. Desta maneira, teve-se como objetivo avaliar o controle desse patógeno através do uso de óleos essenciais e por meio de bactérias, tanto no teste *in vitro* como *in vivo*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. Para o teste *in vitro* foram utilizados 4 diferentes óleos essenciais, *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Melaleuca alternifolia* (tea tree), *Corymbia citriodora* (eucalipto) e *Salvia officinalis* (sálvia dalmaciana), em 4 diferentes concentrações (0, 500, 1000 e 3000 mg L⁻¹); já o uso de bactérias se deu através da técnica de pareamento, testando o efeito antagônico de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* x *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo avaliada a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC %). Para o teste *in vivo*, a dose escolhida dos óleos essenciais foi de 1000 mg L⁻¹ e os tratamentos avaliados foram: T1) testemunha, apenas substrato e sementes sem tratamento e sem a presença do fungo; T2) testemunha, substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* e sementes sem tratamento; T3) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* e sementes tratadas com o óleo essencial de alecrim; T4) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com tea tree; T5) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com eucalipto; T6) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com sálvia dalmaciana; T7) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com *Bacillus subtilis* (3 mL kg⁻¹ de sementes); T8) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com *Bacillus amyloliquefaciens* (3 mL kg⁻¹ de sementes), sendo avaliados a emergência à campo, comprimento, massa fresca e massa seca de plantas. No teste *in vitro* constatou-se que a medida em que as doses dos óleos foram aumentadas, conseqüentemente, o controle do patógeno também é aumentado, assegurando esse controle também no teste *in vivo*, quando comparados à testemunha; já as bactérias no teste *in vitro* não apresentaram inibição tão elevada do patógeno, porém, no teste *in vivo*, além de garantir a sanidade de plantas, o *Bacillus amyloliquefaciens* promoveu o crescimento das plantas.

Palavras-chave: *Helianthus annuus* L.; *in vitro*; *in vivo*; inibição; antibiose.

BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* IN SEEDS AND PLANT GROWTHS OF ORNAMENTAL CROPP

Abstract: Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is now cultivated worldwide, and among the biotic factors that cause production losses we can highlight the occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* which is a destructive pathogen of several economically important crops and difficult to control. Thus, this study aimed to evaluate the control of this pathogen through the use of essential oils and bacteria in both *in vitro* and *in vivo* tests. The experiment was conducted in an entirely randomized design with 4 repetitions. For the *in vitro* test, 4 different essential oils were used, *Rosmarinus officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Corymbia citriodora* and *Salvia officinalis*, in 4 different concentrations each (0, 500, 1000 and 3000 mg L⁻¹), testing the antagonistic effect of *Bacillus subtilis* x *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bacillus amyloliquefaciens* x *Sclerotinia sclerotiorum*, being evaluated the mycelial growth inhibition percentage (PIC %) for all treatments. For the *in vivo* test, the chosen dose of the essential oils was 1000 mg L⁻¹ and the treatments evaluated were: T1) witness, only substrate and seeds without treatment and without the presence of the fungus; T2) witness, substrate + *Sclerotinia sclerotiorum* and seeds without treatment; T3) substrate + *Sclerotinia sclerotiorum* and seeds treated with the essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*); T4) substrate + *Sclerotinia sclerotiorum* + seeds treated with tea tree (*Melaleuca alternifolia*); T5) substrate + *Sclerotinia sclerotiorum* + seeds treated with eucalyptus (*Corymbia citriodora*); T6) substrate + *Sclerotinia sclerotiorum* + seeds treated with *Salvia dalmaciana* (*Salvia officinalis*); T7) substrate + *Sclerotinia sclerotiorum* + seeds treated with *Bacillus subtilis* at a concentration of 3 mL kg⁻¹ seeds; T8) substrate + *Sclerotinia sclerotiorum* + seeds treated with *Bacillus amyloliquefaciens*, at a concentration of 3 mL kg⁻¹ of seeds. In the *in vitro* test, it was found that as the doses of oils were increased, consequently, the control is also increased, ensuring this control also in the *in vivo* test when compared to the control. The bacteria in the *in vitro* test did not show as high inhibition of the pathogen, however, in the *in vivo* test, in addition to ensuring the health of plants, *Bacillus amyloliquefaciens* promoted plant growth.

Key words: *Helianthus annuus* L.; *in vitro*; *in vivo*; inhibition; antibiosis.

1 INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus* L.), é uma planta oleaginosa que faz parte da família botânica Asteraceae. É oriundo da América do Norte e seu cultivo é realizado em todos os continentes, por ser uma cultura de fácil adaptabilidade climática (SILVA *et al.*, 2014).

O cultivo inicial visava a produção de aquênios para alimentação de pássaros; produção de óleo comestível e para a alimentação animal (LIU *et al.*, 2018). Porém, aproximadamente no ano de 2005, a cultura desencadeou o interesse de agricultores, técnicos e empresas, para a fabricação de biodiesel. Com isso, possibilitou-se uma alternativa econômica, principalmente servindo como rotação/sucessão de grãos (BACKES *et al.*, 2008). Além disso, o girassol é uma cultura acumuladora de potássio, permitindo a ciclagem de nutrientes (SILVA *et al.*, 2014).

Outra característica relevante do cultivo do girassol, é o seu desempenho como planta ornamental, apresentando aumento significativo do seu uso nos últimos anos, devido à sua beleza, rusticidade, fácil propagação, manuseio e por apresentar ciclo curto, fato que permite seu cultivo, bem como a produção em diversas regiões, sendo uma ótima alternativa para pequenos produtores (DE MOURA, 2022).

Porém, a cultura é afetada por uma doença bastante comum que é a podridão branca, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, a qual ocasiona o caimento de aquênios ou do capítulo, gerando perda total da produção. Além disso, o fungo permanece muitos anos no solo, através de sua estrutura de sobrevivência (escleródio), implicando não somente em prejuízos para o girassol, mas também para outras culturas suscetíveis implantadas na mesma área (ZIMMER; HOES, 1978; MASIREVIC; GULYA, 1992; NA *et al.*, 2018).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* pode causar sintomas nas diferentes partes da planta de girassol. Na base da haste, o sintoma inicial é uma murcha repentina da planta sem lesões foliares. A lesão possui tonalidade marrom-clara, mole e com aspecto encharcado, podendo ser revestida por micélio branco. Os escleródios podem ser observados no interior do local colonizado na haste. Já na podridão do capítulo, ocorrem lesões pardas e encharcadas no lado dorsal do capítulo, com presença de micélio branco e posterior formação de escleródios dentro da inflorescência. Por fim, ocorre a fragmentação do capítulo, expondo os elementos vasculares fibrosos (ZIMMER; HOES, 1978; MASIREVIC; GULYA, 1992; NA *et al.*, 2018).

Tendo em vista esses aspectos, o controle químico é dificultado, além de ser uma questão preocupante tanto na questão da saúde humana, como também no quesito ambiental, então há uma busca maior por cultivos sem o uso de agrotóxicos. Com isso, há o incentivo pela busca

por modelos alternativos para o controle das doenças, sem que haja tanta dependência do uso de fungicidas e que não seja prejudicial ao meio ambiente e aos seres humanos (DE CAMPOS SIEGA *et al.*, 2020).

O estudo com espécies vegetais que produzem compostos antifúngicos é uma ferramenta importante para o manejo de doenças, podendo auxiliar também na redução da utilização de fungicidas e, por consequência, redução do seu efeito tóxico (PORTELLA *et al.*, 2021). Segundo Costa *et al.* (2011) os óleos essenciais através da sua atividade antifúngica, são capazes de se distribuir pela parede celular e membrana plasmática dos patógenos devido às características hidrofóbicas, os óleos essenciais agem nos lipídeos da parede, membrana celular e mitocôndria, provocando distúrbios e modificações na permeabilidade dessas estruturas.

Outra alternativa de controle de fitopatógenos é através do controle biológico pelo uso de microrganismos antagonistas (MOREIRA *et al.*, 2008; SANTOS; SILVA, 2014). Nesse quesito, há pesquisas com as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), que habitam e sobrevivem na rizosfera, onde auxiliam no crescimento das plantas associadas através de uma relação não simbiótica (CAMPOS, 2010).

Um dos gêneros de rizobactérias com efeito antagonista é o *Bacillus*, que além de desempenhar vários mecanismos antagônicos, é capaz de formar endósporos resistentes, assegurando a sobrevivência da bactéria e a manutenção dos nichos ecológicos específicos, possuindo flexibilidade nos mecanismos de ação contra o ataque de fitopatógenos (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2017).

Tendo em vista que existem poucos fungicidas recomendados para o controle da podridão branca em girassol, e a crescente utilização de métodos alternativos de controle, teve-se por objetivo com o presente trabalho, avaliar o controle *in vitro* e *in vivo* de *Sclerotinia sclerotiorum* por meio da utilização de óleos essenciais e rizobactérias em sementes de girassol ornamental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - Campus Erechim/RS, sob o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições.

Obtenção do material experimental:

Obtenção do isolado de Sclerotinia sclerotiorum: os escleródios do fungo foram obtidos através de plantas de soja que apresentavam sintomas da doença (mofo branco), em lavoura comercial no município de Erechim – RS. Os escleródios foram expostos a assepsia com hipoclorito de sódio a 1% durante 1 minuto em água destilada e esterilizada, realizando três enxagues de 1 minuto cada (TORTELLI *et al.*, 2020). Nas placas de Petri, após a adição do meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA; Himedia™) os escleródios foram colocados e, posteriormente, incubados a 25 ± 2 °C e 12 horas de fotoperíodo (PEREIRA *et al.*, 2009). Depois de 7 dias de incubação, foi feito o reconhecimento do patógeno e, em seguida, a repicagem do fungo para as placas de Petri (com BDA), com a finalidade da obtenção de cultura pura (TORTELLI *et al.*, 2020).

Obtenção dos óleos essenciais: os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), eucalipto (*Corymbia citriodora*) e sálvia dalmaciana (*Salvia officinalis*) foram adquiridos comercialmente da empresa Laszlo®.

Obtenção de Bacillus amyloliquefaciens (3×10^9 UFC mL⁻¹) e *Bacillus subtilis* (3×10^9 UFC mL⁻¹): ambos foram adquiridos da empresa Biovalens LTDA.

2.1 TESTE IN VITRO

Utilizou-se 4 diferentes óleos essenciais, o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), eucalipto (*Corymbia citriodora*), e sálvia dalmaciana (*Salvia officinalis*). Os óleos inicialmente foram emulsionados em Tween 20® a 0,5% (GRAF JUNIOR, 2018), garantindo melhor miscibilidade.

Depois de emulsionados os óleos, os mesmos foram adicionados ao meio de cultura BDA em quatro diferentes concentrações: 0, 500, 1000 e 3000 mg L⁻¹ para cada óleo essencial, sendo que 500 mg corresponde à (0,5 mL), 1000 mg (1 mL) e 3000 (3 mL), levando em consideração essa quantidade relativa para 1 L de BDA. Placas somente com BDA e Tween 20 foram utilizadas como controle (dose 0). A mistura dos óleos nas placas contendo o BDA foi

realizada quando o meio ainda estava líquido, com uma temperatura aproximada de 45 °C. Para obtenção de um inóculo novo, a repicagem do patógeno para as placas ocorreu 3 dias antes da montagem do experimento. No momento do experimento, um disco contendo micélio de *S. sclerotiorum* (5 mm de diâmetro) foi colocado no centro das placas de Petri contendo meio de cultura BDA juntamente com os óleos essenciais nas diferentes concentrações (FONSECA *et al.*, 2015).

As placas posteriormente foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas (GRAF JUNIOR, 2018) e realizou-se a medição do crescimento do patógeno no 3º, 6º, 9º e 12º dia após a repicagem do patógeno para o meio de cultura contendo as doses de óleos essenciais (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2017). Essa avaliação foi feita a partir da medida dos diâmetros das colônias com o auxílio de um paquímetro digital, levando em consideração a média de duas medidas opostas do diâmetro fúngico (FONSECA *et al.*, 2015).

A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada por meio da equação de Menten *et al.* (1976), em que: $PIC = [(diâmetro\ médio\ do\ controle - diâmetro\ médio\ do\ tratamento) / diâmetro\ médio\ do\ controle] \times 100$. Os tratamentos nos quais não foi evidenciada a inibição de crescimento do patógeno obtiveram valor igual a zero.

Para avaliação do efeito antagônico de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, utilizou-se a técnica proposta por Johnson; Curl (1972), em que foi feita 3 estrias através de uma alça de platina a 1,5 cm em relação a borda da placa. Na borda oposta, foi disposto o disco (aproximadamente 5 mm de diâmetro) contendo o micélio fúngico (GABARDO *et al.*, 2020).

As leituras ocorreram no 3º, 6º, 9º e 12º dia após as inoculações. Na avaliação foram feitas medições do diâmetro das colônias, através de três medidas diametralmente opostas, através de um paquímetro digital, determinando uma média por colônia (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2017). A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi determinada através da fórmula de Menten *et al.* (1976).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação entre médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas com o auxílio do *software* estatístico GENES (CRUZ, 2013).

2.2 TESTE *IN VIVO*

O teste *in vivo* foi conduzido em casa de vegetação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 8 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos escolhidos foram os que expressaram os melhores resultados no teste *in vitro*, nos quais a dose escolhida foi de 1000 mg L⁻¹ para todos os óleos.

Os tratamentos avaliados foram: T1) testemunha, apenas substrato e sementes sem tratamento e sem a presença do fungo; T2) testemunha, substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* e sementes sem tratamento; T3) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* e sementes tratadas com o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*); T4) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com óleo essencial (OE) de *tea tree*; T5) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com OE de eucalipto; T6) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com OE de sálvia dalmaciana; T7) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com *Bacillus subtilis*, na concentração de 3 mL kg⁻¹ de sementes; T8) substrato + *Sclerotinia sclerotiorum* + sementes tratadas com *Bacillus amyloliquefaciens*, na concentração de 3 mL kg⁻¹ de sementes.

Foi utilizado sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) adquirido da empresa Isla sementes com 100,0% de pureza e 98,0% de germinação, sem a presença de tratamento químico.

Para a infestação de substrato, os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* foram cultivados em meio fubá, conforme a metodologia adaptada de Garcia *et al.* (2012). Para isso, frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 gramas de fubá + 30 mL de água destilada, foram autoclavados na temperatura de 120 °C ± 1 atmosfera, por 20 minutos. Posteriormente ao resfriamento, foram adicionados 10 discos (Ø 5 mm) de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* por frasco, onde os micélios foram oriundos após 7 dias da repicagem do fungo. Os frascos foram então levados a BOD, em um fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C, por aproximadamente 15 dias.

Antes de expor as sementes aos tratamentos, as sementes foram submetidas à assepsia prévia, no intuito de extinguir possíveis fungos contaminantes presentes na superfície das sementes. No fluxo laminar as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos e, três enxagues sucessivos com água destilada esterilizada por um minuto cada. Após, as sementes foram deixadas por 24 horas em temperatura ambiente para a secagem das mesmas (ORDOÑEZ, 2016).

Para a impregnação dos tratamentos nas sementes, foi utilizada a metodologia adaptada de Cappellaro (2021) para os óleos essenciais por meio de contato indireto. Para isso, um chumaço de algodão foi embebido com 1000 mg L^{-1} de cada óleo essencial e colocado dentro de caixas gerbox. Em seguida, as sementes (40 por gerbox) permaneceram 24 horas sobre uma tela de alumínio posicionada acima do algodão (Figura 1), dentro da gerbox que, posteriormente, foram fechadas.

Figura 1 – Sementes de girassol em gerbox, tratadas com óleo por meio de contato indireto, UFFS, Campus Erechim.



Fonte: autor (2022)

Para o tratamento das sementes com *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* adotou-se a dose de 3 mL kg^{-1} de sementes, deixando-as secar, em temperatura ambiente, por 24 horas.

Após a realização dos tratamentos de sementes, vasos com capacidade para 3,6 L foram preenchidos com substrato e alocados em casa de vegetação. Para a infestação do substrato, foi distribuída uma concentração de 8 g/L do inóculo, cultivado em fubá, por vaso (BARBOSA *et al.*, 2010). Após a infestação do substrato, o mesmo foi irrigado e os vasos foram acondicionados em sacos plásticos por um período de três dias, a fim de formar uma câmara úmida e proporcionar melhor colonização do substrato pelo patógeno. Posteriormente a esses três dias, realizou-se a semeadura de 3 sementes de girassol por vaso. Os vasos foram submetidos a irrigação automática, acionada três vezes ao dia após a semeadura, sendo uma

realizada na parte da manhã, outra próxima ao meio-dia e uma mais à tarde, totalizando 300 mL ao dia.

Após 30 dias da semeadura, avaliou-se a emergência à campo e o comprimento de plântulas. Para a emergência à campo, foi definido o percentual de plântulas emergidas; já para a avaliação do comprimento de plântulas, foi utilizada uma régua milimetrada, levando em consideração a parte aérea e a raiz principal. O comprimento médio por planta foi dado pelo quociente entre o somatório dos comprimentos obtidos / número de plantas medidas (PEDROSO *et al.*, 2008).

Utilizando-se a metodologia proposta por Nascimento *et al.* (2013), imediatamente após a colheita dos girassóis, foi realizada a pesagem da massa fresca das plantas (g), para cada repetição, sendo considerada parte aérea e raiz (planta inteira). Para isso, após a pesagem (realizada em balança devidamente calibrada), as plantas foram embaladas em sacos de papel kraft, e levadas para estufa com ventilação de ar forçado a 65 °C, por 48 horas. Posteriormente, realizou-se a pesagem da massa seca dos girassóis.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação entre médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas através do *software* estatístico GENES (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TESTE *IN VITRO* – ÓLEOS ESSENCIAIS E CRESCIMENTO MICELIAL

Os quatro óleos essenciais, nas diferentes concentrações (0, 500, 1000 e 3000 mg L⁻¹) diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para a percentagem de inibição do crescimento micelial - PIC (%), com uma média de 49,76% (Tabela 1). O maior controle do crescimento micelial foi observado à medida que se aumentou a dose de óleo essencial (Tabela 2; Figura 2).

Tabela 1 – Análise de variância para a percentagem de inibição do crescimento micelial - PIC (%) nos óleos essenciais de alecrim, eucalipto, sálvia dalmaciana e *tea tree*, em diferentes concentrações para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
	PIC (%)			
Tratamentos	19	173861,74	9150,62	340,51*
Resíduo	60	1612,38	26,87	
Total	79	175474,12		
Média		49,76		
Coeficiente de variação (%)		10,42		

* significativo a 5% ($p \leq 0,05$) de probabilidade de erro pelo teste F.

Os óleos essenciais de alecrim (1000 mg L⁻¹ e 3000 mg L⁻¹), eucalipto (1000 mg L⁻¹ e 3000 mg L⁻¹), sálvia dalmaciana (500 mg L⁻¹, 1000 mg L⁻¹ e 3000 mg L⁻¹) e *tea tree* (3000 mg L⁻¹) obtiveram o valor máximo de inibição, ou seja, PIC igual a 100%. Esses tratamentos não diferiram significativamente do óleo essencial de eucalipto (500 mg L⁻¹) com PIC igual a 91,67% (Tabela 2).

Dos óleos essenciais avaliados o de alecrim (500 mg L⁻¹) obteve o menor valor de PIC (10,33%), seguido do óleo essencial de *tea tree* 500 mg L⁻¹ (38,39%) e *tea tree* 1000 mg L⁻¹ (54,71%), respectivamente. Já as testemunhas de cada óleo, obtiveram valor de PIC igual a 0%, e não diferiram significativamente.

Moraes *et al.* (2018) testando os óleos essenciais de canela e citronela para o controle de *Aspergillus spp.* e *Sclerotinia sclerotiorum*, no qual a melhor dose foi de 1,6 mL L⁻¹, afirmaram que esse controle se deu devido a característica antifúngica dos óleos, já que a maioria dos óleos essenciais contém terpenóides, monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados. Os autores destacam que os terpenos são compostos cujo o mecanismo de ação não é muito conhecido, mas, acredita-se que está relacionado com a ruptura da membrana. E conforme a classificação dos fungicidas, óleos essenciais e extratos de plantas, tais como o de *tea tree*, constituem o grupo 46, subgrupo F7 – disruptores de membrana celular (FRAC, 2020).

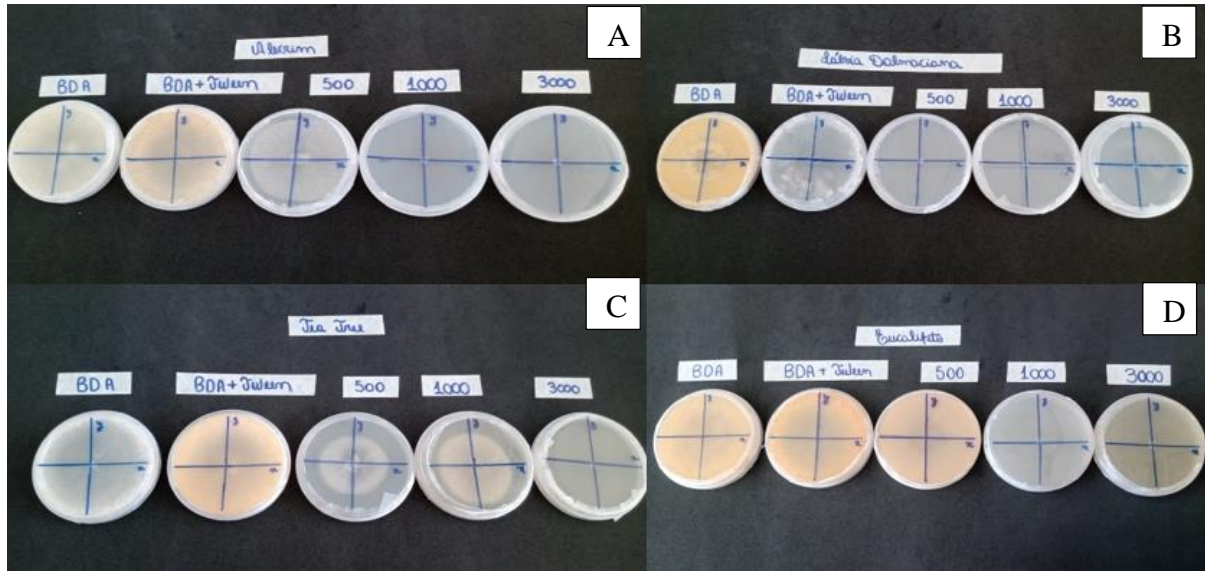
Tabela 2 – Percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC, %) para os óleos essenciais de alecrim, eucalipto, sálvia dalmaciana e *tea tree*, nas concentrações 500, 1000 e 3000 mg L⁻¹, visando o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA.

Tratamentos	Dose (mg L ⁻¹)	PIC (%)
Alecrim	500	10,33 d*
	1000	100,00 a
	3000	100,00 a
Eucalipto	500	91,67 a
	1000	100,00 a
	3000	100,00 a
Sálvia Dalmaciana	500	100,00 a
	1000	100,00 a
	3000	100,00 a
Tea tree	500	38,39 c
	1000	54,71 b
	3000	100,00 a
BDA	0	0,00 e
BDA+Tween	0	0,00 e

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Fonseca *et al.* (2015) testaram a eficiência de óleos essenciais em diferentes concentrações e observaram que o óleo de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), teve o melhor desempenho, inibindo 100% o crescimento fúngico de *Sclerotinia minor*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, na concentração de 3000 mg L⁻¹, e também apresentou eficiência em menores doses, para outros fungos testados, incluindo *Sclerotinia sclerotiorum*. Já o óleo de arnica brasileira, nesse mesmo estudo, na concentração de 3000 mg L⁻¹, reduziu o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em 72% quando comparado ao controle (sem óleo essencial). Tais resultados se assemelham aos obtidos no presente estudo.

Figura 2 – Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por 4 diferentes óleos essenciais (alecrim, sálvia dalmaciana, *tea tree* e eucalipto) em 4 diferentes concentrações (0, 500, 1000 e 3000 mg L⁻¹).



Legenda: Alecrim x *S. sclerotiorum* (A). Sálvia dalmaciana x *S. sclerotiorum* (B). Tea tree x *S. sclerotiorum* (C). Eucalipto x *S. sclerotiorum* (D). Fonte: autor, 2022.

A inibição completa do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em teste *in vitro* com óleo essencial de alecrim, melaleuca (*tea tree*), própolis, e cravo-botão foi obtida com 5 mL de cada óleo em 95 mL de BDA (PORTELLA *et al.*, 2021). Similarmente, o óleo essencial de eucalipto também proporcionou a inibição total do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* quando o patógeno foi exposto as doses de 500 e 1000 ppm, observando também o valor de 44% na área abaixo da curva de crescimento micelial para a dose de 250 ppm, em comparação à testemunha (GRAF JUNIOR, 2018).

E ainda, um estudo realizado por Al-Taisan *et al.* (2014), denotou-se que os óleos de canela, cravo e hortelã inibiram completamente o crescimento fúngico de *Sclerotinia sclerotiorum*, devido à presença do grupo hidroxyl contido no óleo, que é capaz de ser reativo e estabelecer ligações de hidrogênio com locais ativos de enzimas, podendo ser caracterizado com potencial antimicrobiano.

Zhao *et al.* (2022) avaliando o mecanismo antifúngico da pristimerina encontrada em triterpenóides pentacíclicos de metabólitos secundários botânicos contra *Sclerotinia sclerotiorum*, observaram que essa substância pode ser usada como potencial fungicida contra esse patógeno, pois proporcionou inibição de seu desenvolvimento e de escleródios, colaborando com os resultados obtidos no presente estudo.

3.2 TESTE *IN VITRO* – ANTAGONISMO DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* E *BACILLUS SUBTILIS* NO CONTROLE DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

Os tratamentos com *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para a percentagem de inibição do crescimento micelial - PIC (%). A média obtida para a PIC foi 16,19% (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise de variância para a percentagem de inibição do crescimento micelial - PIC (%) para *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	4254,02	1418,01	198,40*
Resíduo	12	85,77	7,15	
Total	15	4339,79		
Média		16,19		
Coeficiente de variação (%)		16,51		

*significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

Conforme a Tabela 4, não houve diferença significativa entre *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* para a variável percentagem de inibição do crescimento micelial – PIC (%), no qual, *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou um PIC de 35,11% e *B. subtilis* 29,66%; porém, houve diferença significativa em relação ao controle (sem *Bacillus* sp.) com PIC igual a 0,00%.

Tabela 4 – Percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC, %) para o antagonismo de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* contra *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA.

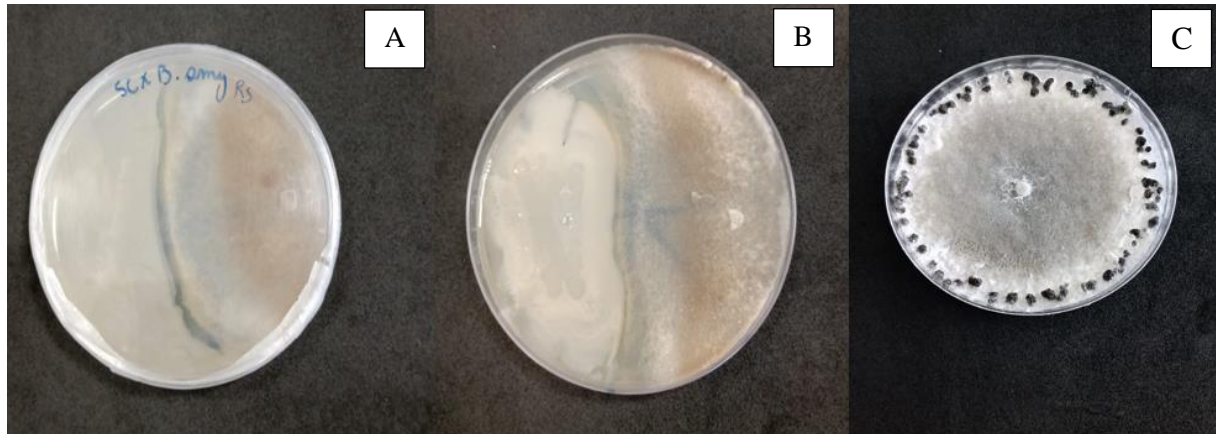
Tratamentos	PIC (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	35,11 a*
<i>Bacillus subtilis</i>	29,66 a
Controle (sem <i>Bacillus</i> sp.)	0,00 b

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nas figuras 3A e 3B pode-se perceber que houve a presença do halo de inibição de ambos os fungicidas microbiológicos testados contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, resultado semelhante ao conduzido por Gabardo *et al.* (2020), que observaram o halo de

inibição de *Bacillus subtilis* com *Sclerotinia sclerotiorum*, porém, houve formação de escleródios. Tal fato não ocorreu na condução do presente trabalho, já que em nenhuma repetição denotou-se a presença escleródios.

Figura 3 – Efeito antagônico de *Bacillus amyloliquefaciens* x *Sclerotinia sclerotiorum* e *Bacillus subtilis* x *Sclerotinia sclerotiorum* e testemunha.



Legenda: ao lado esquerdo da Placa de Petri está disposta a colônia de *Bacillus amyloliquefaciens* e ao lado direito a colônia de *Sclerotinia sclerotiorum* (A). Ao lado esquerdo da Placa de Petri está disposta a colônia de *Bacillus subtilis* e, ao lado direito, a colônia de *Sclerotinia sclerotiorum* (B). Testemunha contendo escleródios (C). Fonte: autor, 2022.

A inibição na formação de escleródios em ambos os tratamentos contendo os fungicidas microbiológicos se torna importante sob o ponto de vista epidemiológico, pois a diminuição da população de escleródios é uma das premissas no controle do mofo branco, haja vista que anula a formação de apotécios e a produção de ascósporos, reduzindo a produção de novos escleródios. Tais fungicidas devem ser posicionados objetivando o controle preventivo do mofo branco na parte aérea das culturas (GÖRGEN *et al.*, 2010).

Em outra pesquisa realizada por Braga Junior *et al.* (2017), onde testaram 7 isolados de *Bacillus subtilis*, foram obtidos valores de PIC semelhantes com os do presente trabalho, quando utilizada a técnica de pareamento de culturas. Para os autores, a inibição de *Fusarium subglutinans* por *Bacillus subtilis* (isolado UFTBs 03) teve um valor de PIC igual a 37,9% após 12 dias de incubação; já a inibição de *Bipolaris* sp. por *Bacillus subtilis* (isolados UFTBs 05 e UFTBs 07) teve um valor de PIC máximo de 25,1%, após 12 dias de incubação. A inibição de crescimento micelial de *Curvularia lunata* por *Bacillus subtilis* (isolado UFTBs 07) atingiu um PIC de 43,3%, após 12 dias de incubação. Esses resultados se assemelham aos encontrados neste estudo.

Essa inibição de crescimento, assim como a formação do halo de inibição, se dá pelo fato das bactérias possuírem um vasto espectro de ação, agindo por antibiose, produzindo substâncias tóxicas aos fungos. Tal mecanismo de ação antagônico é assegurado por muitos metabólitos, como lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina. Ainda, quando se estabelece uma relação de contato entre bactéria e fungos fitopatogênico, ocorre a síntese de antibióticos e a competição por nutrientes e pelo espaço (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2017).

3.3 TESTE *IN VIVO* – EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E CONTROLE BIOLÓGICO DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* EM PLÂNTULAS DE GIRASSOL ORNAMENTAL

Os tratamentos avaliados diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$) para emergência de plantas, comprimento, massa fresca e massa seca. A média obtida foi de 76,39% para emergência, 23,30 cm para comprimento, 12,97 g para massa fresca e 1,90 g para massa seca (Tabela 5).

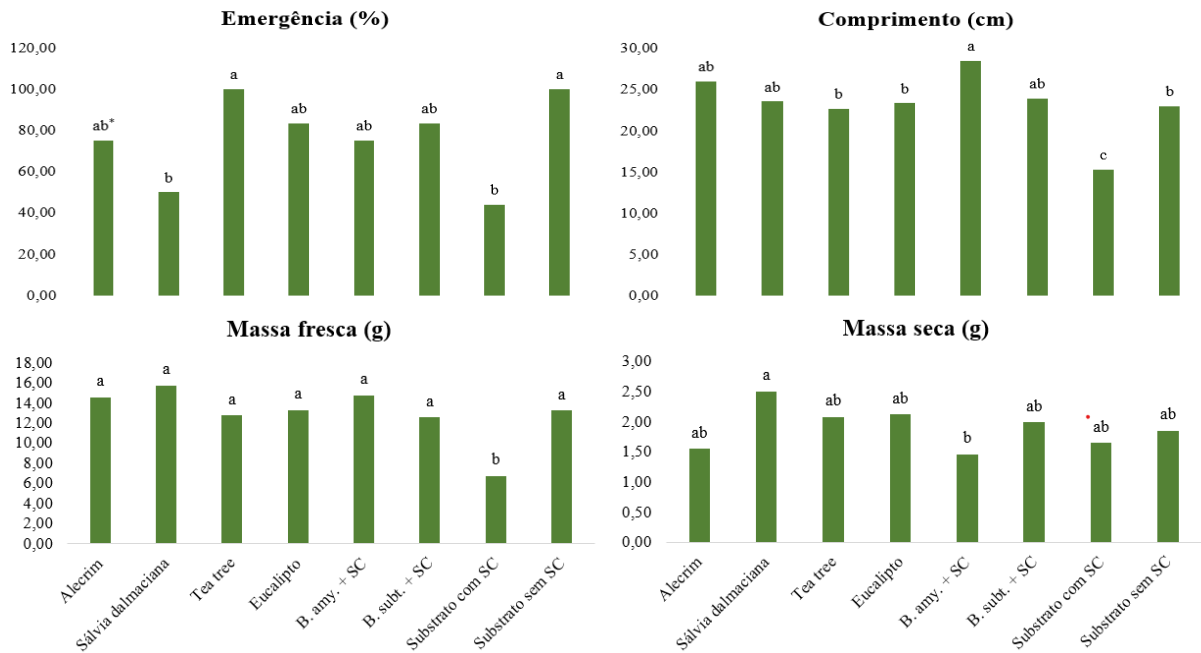
Tabela 5 – Análise de variância para emergência (%), comprimento (cm), massa fresca (g) e massa seca (g) em plântulas de girassol ornamental cujas sementes foram tratadas com óleos essenciais (alecrim, sálvia dalmaciana, *tea tree* e eucalipto) na dose 1000 mg L⁻¹, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* (ambos 3 mL kg⁻¹ de sementes), e semeadas em substrato infestado ou não com *Sclerotinia sclerotiorum*.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	7	11714,95	1673,56	4,19*
Resíduo	24	9578,89	399,12	
Total	31	21293,84		
Média		76,39		
Coeficiente de variação (%)		26,15		
Comprimento (cm)				
Tratamentos	7	396,06	56,58	12,53*
Resíduo	24	108,39	4,52	
Total	31	504,45		
Média		23,30		
Coeficiente de variação (%)		9,12		
Massa fresca (g)				
Tratamentos	7	209,26	29,89	10,16*
Resíduo	24	70,65	2,94	
Total	31	279,91		
Média		12,97		
Coeficiente de variação (%)		13,22		
Massa seca (g)				
Tratamentos	7	3,32	0,47	2,74*
Resíduo	24	4,16	0,17	
Total	31	7,48		
Média		1,90		
Coeficiente de variação (%)		21,89		

*Significativo: $p \leq 0,05$, pelo teste F.

As sementes que foram tratadas com óleo essencial de *tea tree* e o tratamento testemunha sem a presença de *Sclerotinia sclerotiorum* tiveram 100,00% de emergência (Figura 4). Por outro lado, o tratamento testemunha inoculado com *Sclerotinia sclerotiorum*, assim como as sementes tratadas com o óleo essencial de sálvia, obtiveram percentuais de emergência correspondentes a 44,05% e 50,00%, respectivamente.

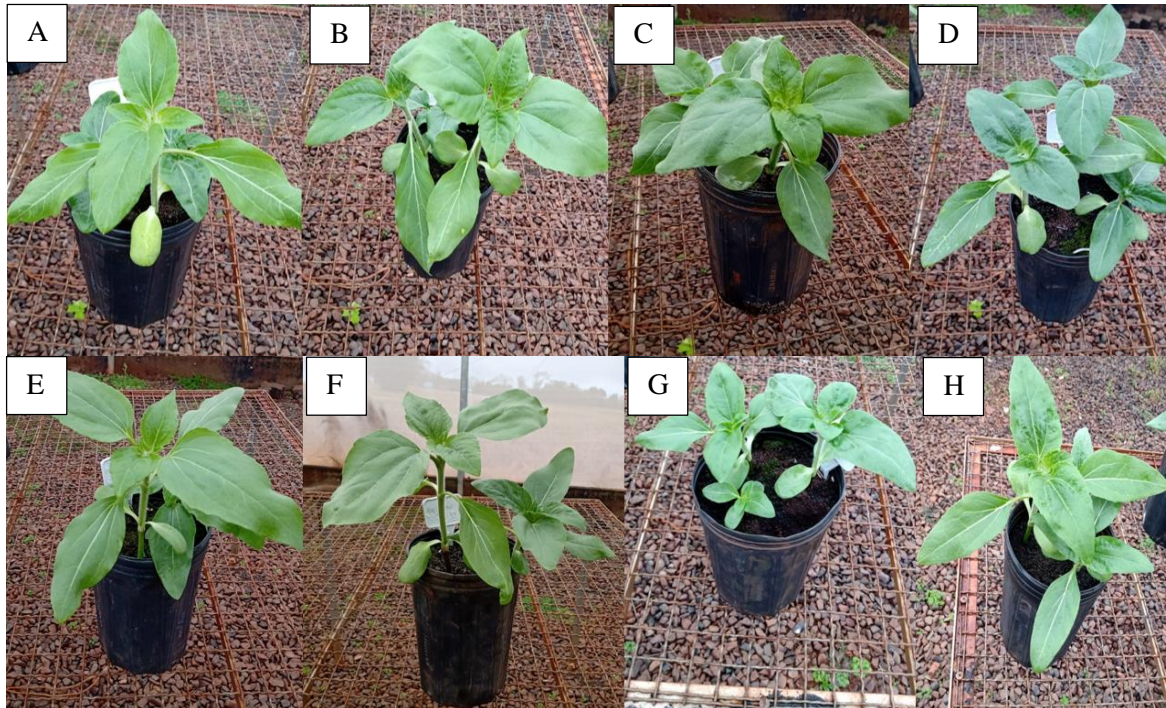
Figura 4 – Emergência (%), comprimento (cm), massa fresca (g) e massa seca (g) de plântulas de girassol ornamental cujas sementes foram tratadas com óleos essenciais (alecrim, sálvia dalmaciana, tea tree e eucalipto; dose 1000 mg L⁻¹), *Bacillus amyloliquefaciens* (B. amy.) e *Bacillus subtilis* (B. subt.) – (ambos 3 mL kg⁻¹ de sementes), e semeadas em substrato infestado ou não com *Sclerotinia sclerotiorum* (SC).



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para a variável comprimento de plântulas, o tratamento com *Bacillus amyloliquefaciens* + *Sclerotinia sclerotiorum* (Figura 4 e 5) obteve o maior valor (28,52 cm); em contrapartida, a testemunha com *Sclerotinia sclerotiorum* apresentou o valor mais baixo para essa variável (15,33 cm).

Figura 5 – Plântulas de girassol ornamental cujas sementes foram tratadas com óleos essenciais na dose de 1000 mg L^{-1} , *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* – (ambos 3 mL kg^{-1} de sementes), e semeadas em substrato infestado ou não com *Sclerotinia sclerotiorum* (SC).



Legenda: alecrim + *Sclerotinia sclerotiorum* (SC) (A); sálvia dalmaciana + SC (B); tea tree + SC (C); eucalipto + SC (D); *Bacillus amyloliquefaciens* + SC (E); *Bacillus subtilis* + SC (F); substrato infestado sem tratamento, com *Sclerotinia sclerotiorum* (G) e substrato sem tratamento, não infestado com *Sclerotinia sclerotiorum* (H). Fonte: autor, 2022.

Em relação a massa fresca, os tratamentos não diferiram significativamente entre si, com exceção à testemunha com *Sclerotinia sclerotiorum* que obteve valor de 6,77 g (Figura 4). Para massa seca o maior valor foi observado quando as sementes receberam tratamento com OE de sálvia (2,50 g). Já o menor valor foi obtido no tratamento com *Bacillus amyloliquefaciens* + *Sclerotinia sclerotiorum* (1,46 g).

Venturoso *et al.* (2014) testando a inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em nabo forrageiro, cártamo, girassol e crambe, verificaram que houve redução de emergência maior que 60% para o nabo forrageiro, girassol, cártamo e crambe. Os autores ainda destacaram que o fungo levou à morte das sementes antes mesmo de ocorrer a germinação, demonstrando assim a agressividade do patógeno.

Também foi constatado nesse mesmo estudo, a relação da redução do IVE (índice de velocidade de emergência) e da emergência, considerando que se a semente demora mais tempo para germinar e a plântula para emergir, conseqüentemente, o tempo de contato da semente com o fungo é maior, atrelado ao fato que esse atraso na germinação faz com que seja aumentado os

níveis de açúcares liberados pela semente, facilitando a infecção pelo patógeno (VENTUROSO *et al.*, 2014).

Pelo exposto, percebe-se que os óleos essenciais e as rizobactérias tem potencial para controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, quando comparado com a testemunha em que havia a presença do fungo e que apresentou baixo valor de emergência (Figura 4 e 6), comprimento e de massa fresca de plântulas. Vale destacar ainda que o *Bacillus amyloliquefaciens* além de controlar o patógeno, apresentou melhora no crescimento da planta (variável comprimento), pois mesmo sendo observada a colonização das raízes das plântulas pelo patógeno, as mesmas continuaram vigorosas e sem a presença de sintomas (Figura 7).

Figura 6 – Testemunha com *Sclerotinia sclerotiorum*, sem a presença de tratamento



Fonte: autor (2022)

Figura 7 – Planta de girassol tratada com *Bacillus amyloliquefaciens* contendo escleródios



Fonte: autor (2022)

O gênero de rizobactérias *Bacillus* tem ação em diversos mecanismos na planta, podendo atuar por antibiose direta, no crescimento do vegetal e induzindo a resistência sistêmica nos hospedeiros da planta. Por isso, essas bactérias podem atuar indiretamente competindo com o patógeno por nutrientes ou espaço; ou de forma direta através da síntese de lipopeptídeos e, ainda, podem induzir a resistência por meio de compostos voláteis, como álcoois, aldeídos, entre outros (DIMKIC *et al.*, 2022).

Os lipopeptídeos e compostos voláteis produzidos por *Bacillus* são capazes de dar estímulos aos genes que codificam proteínas relacionadas a defesa da planta, ativando rotas bioquímicas do ácido jasmônico e ácido salicílico, ou mesmo a sinalização do etileno. Estes compostos também estimulam as proteínas relacionadas a patogênese (RP-Proteínas). Além disso, os compostos voláteis podem reduzir a expressão de genes que são responsáveis, pelo crescimento micelial, penetração, esporulação e virulência dos fungos (DIMKIC *et al.*, 2022).

Sobre o efeito dos óleos essenciais pode-se explicar, principalmente, pelas alterações provocadas na parede celular, membrana plasmática e mitocôndria dos patógenos, já que conforme a classificação dos fungicidas, óleos essenciais e extratos de plantas, tais como o de *tea tree*, constituem o grupo 46, subgrupo F7 – disruptores de membrana celular (FRAC, 2020), e ainda, Bernardi; Siega; Rey (2019) comprovaram que os óleos essenciais de *Cynamomum zeylanicum*, *Syzigium aromaticum*, *Eugenia uniflora* e *Thymus vulgaris*, tiveram tamanho médio de escleródio igual a zero, diferindo da testemunha, demonstrando assim, o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Segundo Menezes Filho; Cruvinel; Souza Castro (2020), a utilização de óleos essenciais está trazendo bons resultados no controle de diversos fungos que acometem culturas de

interesse agrícola, como o milho, soja, grão de bico, entre outras, sendo uma alternativa de controle natural dos patógenos. O emprego de óleos essenciais e de rizobactérias do gênero *Bacillus*, tais como as que foram utilizadas no presente trabalho, constituem uma alternativa de suma importância para o meio agrícola tendo em vista o patossistema mofo branco vs girassol ornamental. Essas alternativas para o controle dessa doença enquadram-se na perspectiva de uma menor dependência de fungicidas químicos na cadeia de produção agrícola, respondendo aos anseios da sociedade por produtos menos contaminados com agrotóxicos.

4 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de alecrim, eucalipto, *tea tree* e sálvia dalmaciana, bem como o uso de agentes biológicos (*Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*) promovem o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto *in vitro* como *in vivo*.

A inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* pelas rizobactérias *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* impede a formação de escleródios no teste *in vitro*. No teste *in vivo*, além de controlar o fungo, o *Bacillus amyloliquefaciens* proporciona aumento no comprimento de plântulas de girassol ornamental.

REFERÊNCIAS

- AL-TAISAN, W. A. *et al.* Effective influence of essential oils and microelements against *Sclerotinia sclerotiorum*. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, n.5, p. 275-281, 2014.
- BACKES, R. L. *et al.* Desempenho de cultivares de girassol em duas épocas de plantio de safrinha no planalto norte catarinense. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p. 041-048, 2008.
- BARBOSA, R. N. T. *et al.* Método para inoculação de *Sclerotium rolfsii* em tomateiro. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 4, n. 1, p. 49-52, 2010.
- BERNARDI, C.; SIEGA, T. de C.; REY, M. dos S. Influência de óleos essenciais no desenvolvimento de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal da Podridão Branca da Haste da Soja. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 2, p. 227-228, 2019.
- BRAGA JUNIOR, G. M. *et al.* Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis in vitro*. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 7, n. 3, p. 45-51, 2017
- CAMPOS, J. T. de. **Rizobactérias promotoras do crescimento de cana-de-açúcar**. Orientadora: Sueli dos Santos Freitas. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Gestão de Recursos Agroambientais, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2010.
- CAPPELLARO, S. **Controle biológico e alternativo no tratamento de sementes para o manejo da podridão comum de raízes em trigo**. Orientadora: Paola Mendes Milanesi. 2021. 31 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS, 2021.
- COSTA, A. R. T. *et al.* Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.
- CRUZ, C. D. GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum.Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- DE CAMPOS SIEGA, T. *et al.* Control of mycelial and carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary with essential oils from 17 plant species. Research, **Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e11991210844-e11991210844, 2020.
- DE MOURA, S. R. *et al.* Longevidade e qualidade pós-colheita de girassol ornamental de corte. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 17, n. 2, p. 1-7, 2022.
- DIMKIC, I. *et al.* Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 117, s/n, p. 101754, 2022.

FONSECA, M. C. M. *et al.* Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, s/n, p. 45-50, 2015.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE – FRAC. **FRAC Mode of Action Poster**. Disponível online em: <<https://www.frac.info/publications/downloads>>. Acesso em: 18 jul. 2022.

GABARDO, G. *et al.* *Trichoderma asperillum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 6, n. 8, p. 55870-55885, 2020.

GARCIA, R. Á. *et al.* Production of sclerotia on *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary in culture media. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2012.

GÖRGEN, C. A. *et al.* Redução do inóculo inicial de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja cultivada após uso do sistema Santa Fé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1102-1108, 2010.

GRAF JUNIOR, A. L. **Uso de Óleos Essenciais no Controle do Fungo *Sclerotinia sclerotiorum***. Orientadora: Adriana Terumi Itako. 2018. 42 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, SC, 2018.

JOHNSON, L. F.; CURL, A. **Methods for research on the ecology of soil born plant and pathogens**. Alabama: Burgess Publishing. 274 p., 1972.

LIU, J. *et al.* Mycelial compatibility group and genetic variation of sunflower *Sclerotinia sclerotiorum* in Northeast China. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 102, s/n, p. 185-192, 2018.

MASIREVIC, S.; GULYA, T. J. *Sclerotinia* and *Phomopsis* - two devastating sunflower pathogens. **Field Crops Research**, v. 30, s/n, p. 271- 300, 1992.

MENTEN, J. O. M. *et al.* Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MENEZES FILHO, A. C. P.; CRUVINEL, W de S.; SOUZA CASTRO, C. F. de. Composição química dos óleos essenciais de *Schinus molle* e atividade antifúngica em *Sclerotinia sclerotiorum*. **Colloquium Agrariae**, v. 16, n. 3, p. 104-114, 2020.

MOREIRA, C. G. Á. *et al.* Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 332-7, 2008.

MORAES, S. de P. C. B. *et al.* Cinnamon and citronella essential oils in the *in vitro* control of the fungi *Aspergillus* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 35, p. 1811-1815, 2018.

NA, R. *et al.* Responses of sunflower induced by *Sclerotinia sclerotiorum* infection.

Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 102, s/n, p. 113-121, 2018.

NASCIMENTO, N. V. do. *et al.* Efeito residual da adubação orgânica no crescimento do girassol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 2, p. 04-12, 2013.

ORDOÑEZ, L. M. I. **Eficiência de óleos essenciais para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae* em sementes de cebola e seu efeito na qualidade fisiológica.** Orientador: Warley Marcos Nascimento. 2016. 86 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

PEDROSO, D. C. *et al.* Physiological and sanitary quality of *Zinia elegans* Jacq. seeds from different harvest time. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, s/n, p. 164-171, 2008.

PEREIRA, C. E. *et al.* Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, v. 39, s/n, p. 2390-2395, 2009.

PORTELLA, J. *et al.* Óleos essenciais no controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Thema**, v. 19, n. 3, p. 615-622, 2021.

SANTOS, M. S. B.; SILVA, A. A. C. R. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 511-517, 2014.

SILVA, S. S. *et al.* Crescimento do girassol com níveis de reposição hídrica e adubação potássica. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 10, n. 2, p. 104-110, 2014.

TORTELLI, B. *et al.* Treatments for *Sclerotinia sclerotiorum* on inoculated bean seeds and effects on health and physiological quality. **Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 1, p. 371-386, 2020.

VENTUROSOSO, L. dos R. *et al.* Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 788-793, 2014.

ZHAO, W. B. *et al.* Antifungal activity and preliminary mechanism of pristimerin against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Industrial Crops and Products**, v. 185, s/n, p. 115124, 2022.

ZIMMER, D. E.; HOES, J. A. **Diseases.** In: CARTER, J. F. (Ed.). *Sunflower science and technology.* Madison: American Society of Agronomy, v. 19, s/n, p. 225-262, 1978.

ANEXOS

Figura 8 – Visão geral do experimento em casa de vegetação, antes da colheita, UFFS, Campus Erechim, 2022.



Fonte: autor (2022)

Figura 9 – Erlenmeyers contendo colonização de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio fubá – UFFS, Campus Erechim, 2022.



Fonte: autor (2022)