

Meios de cultura e efeito do óleo essencial de melaleuca no crescimento micelial de *Stemphylium* sp.

Culture media and effect of melaleuca essential oil in *Stemphylium* sp. micelial growth

Flávia de Oliveira Borges Costa Neves¹ , Luciana Santos Rodrigues Costa Pinto¹ , Marcia Toyota Pereira² , Henrique Gualberto Vilela Penha¹  e Igor Souza Pereira^{1*} 

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Campus Uberlândia, Curso de Engenharia Agrônômica, Uberlândia, MG, Brasil.

² Faculdade Unyleya de Pós-graduação, Polo de Pós-graduação Uberlândia. Uberlândia, MG, Brasil.

*Autor para correspondência:

igor@iftm.edu.br

Conflitos de Interesse:

Os autores declaram não ter conflito de interesse

Licença:

Artigo publicado em acesso aberto sob uma licença Creative Commons CC-BY

Contribuição do autor:

Todos os autores fizeram contribuições substanciais para a concepção e desenho deste estudo, para a análise e interpretação dos dados, revisão do manuscrito e aprovação da versão final. Todos os autores assumem responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito.

Histórico:

Recebido: 15/02/2019;
Aceito: 26/06/2021

Período de publicação:

Janeiro-Junho de 2021

RESUMO

Espécies do gênero *Stemphylium* são responsáveis por uma série de doenças de plantas, como as solanáceas, com destaque para a queima-de-estenfílio, que afeta a produtividade de culturas carentes em fungicidas disponíveis. Diante disso, propôs-se com esse trabalho a determinação de um meio de cultura que viabilizasse o crescimento micelial de *Stemphylium* sp. isolado de cebola para posterior avaliação do efeito do óleo de melaleuca (*M. alternifolia*), sob diferentes concentrações *in vitro*, no desenvolvimento desse patógeno. Para isso, no primeiro ensaio foram testados oito meios de cultura: Batata-Dextrose-Ágar (BDA); Suco V-8® Ágar a 5%; Suco V-8® Ágar a 10%; Suco V-8® Ágar a 20%; Suco de Tomate a 5% (ST5%); Suco de Tomate a 10% (ST10%); Suco de Tomate a 20% (ST20%) e Extrato de Malte Ágar 2%. Aos 10 dias e aos 15 dias o maior crescimento foi identificado com os tratamentos ST20% e BDA e opostamente, os tratamentos V8-5% e V8-10% o menor crescimento. No segundo ensaio, o óleo de melaleuca foi testado em cinco concentrações (0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8%) diluído em BDA e se determinou o IVCM (índice de velocidade do crescimento micelial). O óleo essencial de melaleuca reduziu significativamente o crescimento micelial de *Stemphylium* sp. com melhor ajuste à equação quadrática $y = 28,074x^2 - 46,136x + 19,94$. Conclui-se que o meio de cultura ST20% proporcionou o maior crescimento *in vitro* e que o óleo de melaleuca adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 0,6 e 0,8% foram capazes de reduzir o IVCM, podendo representar alternativa promissora para o controle deste patógeno.

Palavras-chave: Controle *in vitro*, *Melaleuca alternifolia*, Queima-de-estenfílio

ABSTRACT

Species of *Stemphylium* genus are responsible for many plant diseases, as solanaceas in which *stemphylium* leaf blight, which productivity of these crops can be negatively affected due lacking in available fungicides. Therefore, the purpose of this work was to determine a culture medium that would allow of *Stemphylium* sp. mycelial growth isolated from onion for a later evaluation of melaleuca oil (*M. alternifolia*) effect under different *in vitro* concentrations. For this, in the first test eight culture media were tested: Potato-Dextrose-Agar (PDA); Juice V-8® 5% Agar; V-8® Juice 10% Agar; Juice V-8® Agar 20%; Tomato Juice 5% (ST5%); Tomato Juice 10% (ST10%); Tomato Juice 20% (ST20%) and Malt Extract Agar 2%. At ten days and fifteen days, the highest growth was identified with treatments ST20% and PDA and, conversely, treatments V8-5% and V8-10% the lowest growth. In the second trial, melaleuca oil was tested in five concentrations (0; 0, 2; 0,4; 0,6 and 0,8%) diluted in PDA and the MGR (mycelial growth rate) was determined. The melaleuca essential oil reduced the *Stemphylium* sp. mycelial growth with better fit to the quadratic equation $y=28,074x^2 - 46,136x + 19,94$. The MGR was reduced by the oil added to culture medium and could represent a promising alternative for this pathogen control.

Key words: *In vitro* control, *Melaleuca alternifolia*, *Stemphylium* leaf blight

INTRODUÇÃO

Espécies de *Stemphylium* são responsáveis por diversas doenças em plantas cultivadas como a podridão radicular em cenoura (*Daucus carota* L. var. *sativa*), causada por *S. radicinum*, a mancha foliar em alfafa (*Medicago sativa* L.), causada por

S. botryosum, a mancha-de-estenfílio em aliáceas, causada por *S. vesicarium* e a mancha-de-estenfílio em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) causada por *S. solani* entre outras (Miller & Lacy, 1995).

Em Aliaceae (*Allium* spp.), a queima-de-estenfílio, causada por *S. vesicarium* e em menor intensidade por *S. botryosum*, é considerada uma das mais importantes doenças de parte aérea nessa família em todo o mundo (Cramer, 2000). Ocorre com maior severidade em condições climáticas em que prevalecem altas temperaturas e elevada umidade relativa do ar (Suheri & Price, 2000a, b). Essa doença ocorre associada à queima púrpura das Aliaceae, causada por *Alternaria porri* (Ellis) Cif., cujos sintomas destas normalmente são indistinguíveis, sendo considerado como um complexo causado por ambos patógenos (Suheri & Price, 2001).

Uma importante etapa nos estudos de fitopatógenos em condições controladas e no campo é o cultivo do microrganismo em condições assépticas para produção massal de estruturas reprodutivas (Leão, Santos, Sarmento, Reis & Chagas Júnior, 2012). A maioria dos microrganismos cultiváveis cresce em meios contendo uma fonte de carbono e nitrogênio, além de outros elementos em menor quantidade, como potássio, fósforo, enxofre, ferro, magnésio, zinco, manganês e vitaminas (Alfenas & Mafia, 2016). Contudo, a composição do meio de cultura depende do microrganismo que se deseja cultivar e dos objetos de estudo.

São poucos os meios de cultura citados na literatura para o crescimento de *Stemphylium* sp. Entre eles destacam-se o de Phytone-dextrose ágar para a esporulação e o Suco V-8® Ágar para o crescimento e esporulação de *Stemphylium* (Dhingra & Sinclair, 1995; Miller, 1955). Diante da escassez de informações sobre o crescimento do fungo *Stemphylium* spp. *in vitro*, o uso de diferentes meios de cultura constitui uma forma de se avaliar aquele que é mais propício para o seu crescimento e desenvolvimento.

Em decorrência dos problemas ocasionados pelo uso intensivo de agrotóxicos, torna-se imprescindível a busca por medidas alternativas no controle de doenças através do uso de produtos naturais, que podem se tornar eficientes e de baixo impacto ambiental. Além disso, não há fungicidas registrados para o manejo da mancha-de-estenfílio no país (Ministerio de Agricultura Pecuária e Abastecimiento, 2018).

Como medidas de manejo de doenças fúngicas, sobretudo para aquelas em que não há fungicidas registrados, os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis e óleos etéreos constituem-se como medida alternativa, visto que possuem atividade antibacteriana e antifúngica (Ramos, Andreani Junior & Kozusny - Andreani, 2016).

Podendo ser extraído de plantas aromáticas e medicinais, os óleos são obtidos de diversas partes dessas plantas, como: folhas, flores, sementes,

raízes, cascas e tubérculos (Trajano & Santos, 2009). Dentre os óleos essenciais promissores para o controle de fungos fitopatogênicos destaca-se o óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden e Betche, Cheel - Família Myrtaceae), que possui como componente majoritário o terpinen-4-ol (entre 30 e 40%) seguido de γ -terpineno (entre 10 e 28%), α -terpineno (entre 5 e 13%), 1,8-Cineole ($\leq 15\%$) (Castelo et al., 2013; Carson, Hammer & Riley, 2006).

O óleo de melaleuca possui atividade fungicida e fungistática em fungos filamentosos (Hammer, Carson & Riley, 2004), sendo seu efeito comprovado sobre *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Alternaria alternata* nas concentrações acima de 0,2%, incorporado ao meio de cultura (Santos Martins, Sagata, Araújo Santos & Juliatti, 2010), ao *Colletotrichum gloeosporioides* em concentração acima de 0,46% (Marinelli, Orzali, Lotti & Riccioni, 2012), ao *Botrytis cinerea* em folhas de repolho nas concentrações de 1,6% e 3,2% (Bishop & Reagan, 1998), bem como a eliminação da carga microbiana de *C. gloeosporioides* na concentração de 0,8% com tempo de exposição mínima de 40 minutos (Ramos et al., 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial de *Stemphylium* sp. sob diferentes meios de cultura para posteriormente determinar o efeito do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) no índice de velocidade de crescimento micelial *in vitro* desse patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro – Campus Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

O isolado de *Stemphylium* sp. foi obtido de folhas de cebola var. Mercedes, híbrido de dias curtos para climas tropicais, folhagem vigorosa e resistente à raiz rosada (*Pyrenochaeta terrestris*). Plantas com sintomas típicos da doença foram coletadas de uma lavoura comercial situada no município de Santa Juliana, MG.

Partes infectadas das folhas foram cortadas em pequenos pedaços com ± 1 cm² cada, lavados em água destilada e esterilizadas pela imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% por dois minutos, em seguida imersos em solução de etanol a 70% por um minuto e enxaguado três vezes em água esterilizada. Cinco fragmentos foram depositados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 mL do meio batata dextrose agar (BDA) (Suheri & Price, 2000a). Três replicatas foram realizadas para cada amostra.

As placas foram incubadas em câmara climatizada (BOD) a $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 12h por 5-6 dias. Os fungos foram purificados pela inoculação em placas de Petri contendo BDA e a identificação dos isolamentos fúngicos foram realizadas com base nas características macro e microscópicas (Ellis, 1971). O isolado puro foi conservado em vidros com água destilada esterilizada seguindo-se a metodologia de Castellani (1939) para ensaios posteriores.

Ensaio 1: Meios de cultura para o crescimento de *Stemphylium* sp. *in vitro*.

Sete diferentes meios de cultura foram avaliados nesse trabalho, quais sejam: 1. Batata Dextrose Ágar (BDA); 2. Suco V-8® Ágar 5%; 3. Suco V-8® Ágar 10%; 4. Suco V-8® Ágar 20%; 5. Suco de tomate 5% (ST-5%); 6. Suco de tomate 10% (ST-10%); 7. Suco de tomate 20% (ST-20%) e 8. MEA 2% (extrato de malte – ágar). O suco V-8® utilizado é da marca Campbell's® composto por 90% de suco de tomate e complementado por suco de cenoura, suco de beterraba, suco de salsa, suco de aipo, suco de alface, suco de agrião e suco de espinafre. O suco de tomate utilizado é da marca Superbom® composto exclusivamente por suco de tomate integral.

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C (1 atm; pressão relativa) por 20 minutos e vertidos assepticamente em placa de Petri. Para cada placa de Petri contendo 15 mL de meio foi repicado um disco de 5 mm de diâmetro, retirado das bordas de colônias desenvolvidas em meio BDA, durante seis dias, $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro.

As placas foram incubadas em BOD a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. Após dez e quinze dias de crescimento, as colônias foram medidas em dois sentidos perpendiculares entre si, tomando-se como valor a média. O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizadas (DIC) com oito tratamentos e seis repetições constituídas de uma placa de Petri. Os dados foram avaliados pelo teste de F e as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico Sisvar® (Ferreira, 2000).

Ensaio 2: Efeito do óleo essencial de melaleuca (*M. alternifolia*) sobre o IVCM

O óleo de melaleuca utilizado nesse estudo é puro e foi obtido comercialmente de uma empresa especializada registrada na ANVISA. O óleo foi incorporado ao meio de BDA à temperatura de 45°C e autoclavado após diluições em série para se obter as seguintes concentrações: 0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8%. Discos de 0,6 cm de diâmetro contendo colônias puras do fungo *Stemphylium* sp foram transferidos para o centro da placa de Petri, com os seus respectivos tratamentos e armazenadas em câmara

de crescimento a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos e cinco repetições sendo o IVCM calculado e os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, à análise de regressão por meio do software SISVAR® (Ferreira, 2000).

A avaliação do crescimento micelial foi realizada, a cada 24 h, durante 11 dias, pela medição do diâmetro das colônias nos dois sentidos perpendiculares entre si. Utilizou-se como valor a média a partir do momento em que foi adicionado o disco de micélio com o isolado no meio de cultura. O índice de velocidade de crescimento micelial foi calculado conforme a fórmula: $\text{IVCM} = \frac{\sum(D-D_a)}{N}$, onde, D = diâmetro médio atual da colônia (cm); D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior (cm); N = número de dias após a inoculação (dias).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio 1: Avaliação do crescimento do *Stemphylium* sp. em diferentes meios de cultura.

O meio de cultura influenciou no crescimento micelial do fungo nas condições estudadas. Aos 10 dias o maior crescimento foi observado com a inoculação do fungo nos meios de cultura ST-20% (71,08 cm) e BDA (65,41 cm), enquanto o menor crescimento foi observado no tratamento V8® Ágar 5% (46,30 cm). Aos 15 dias novamente os tratamentos ST-20% e BDA acarretaram no maior crescimento micelial e, opostamente, os tratamentos V8® Ágar 5% e V8® Ágar 10% o menor crescimento. Os demais tratamentos proporcionaram resultados medianos em ambas as avaliações (Tabela 1).

Os componentes presentes nos meios de cultura enriquecidos têm a finalidade de imitar ou de se aproximar do efeito dos nutrientes químicos naturais presentes nas folhas das plantas, a fim de se obter um efeito semelhante de crescimento como naquele encontrado na natureza. Sabe-se que a composição do meio de cultura, a temperatura e luminosidade determinam a quantidade e qualidade do crescimento micelial dos fitopatógenos (Dhingra & Sinclair, 1995).

Para Dhingra e Sinclair (1995), os meios de cultura que contenham extratos e sucos de folhas e de partes vegetais normalmente estimulam o crescimento micelial e esporulação de fungos. O meio de cultura BDA é frequentemente utilizado para o crescimento micelial e esporulação de espécies de *Alternaria* entre outras (Ávila, Mello Ribeiro & Fontes, 2000; Teixeira, Chitarra, Arias & Machado, 2001).

Destaca-se ainda que o efeito do meio de cultura não pode ser considerado isoladamente para a

Tabela 1. Média da avaliação (aos 10 e 15 dias) de diferentes meios de cultura no crescimento micelial (cm) de *Stemphylium* sp. isolados de cebola. IFTM, Uberlândia, 2017.

Meios de cultura	10 dias (cm)	15 dias (cm)
ST-20%	71,08 a	84,10 a
BDA	65,41 a	90,02 a
V-8® Ágar 10%	58,75 b	73,01 b
V8® Ágar 20%	57,33 b	77,48 b
ST-10%	53,50 b	65,20 b
MEA	53,25 b	71,41 c
ST-5%	46,30 c	64,96 d
V8® Ágar 5%	33,50 d	69,56 d
CV (%) =	13,30	7,89
Média geral =	54,95	74,47
Erro padrão médio =	2,9831	2,3998

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de *Scott-Knott*.

determinação do crescimento micelial de fungos em geral, estando associado a outros fatores ambientais tais como a temperatura, comprimentos de onda da luz durante a incubação, tipo de injúria aplicada à colônia micelial e fotoperíodo entre outros (Dias, 2012).

Associados a esses fatores destaca-se ainda a origem do isolado, observando-se inclusive uma diferenciação de crescimento de uma mesma espécie fúngica obtido de diferentes espécies vegetais, tal como relatado por Fancelli (1991) sobre a resposta diferenciada de isolados de *Alternaria solani* obtidos de batateira e tomateiro, necessitando-se de injúrias para esporulação dos isolados provenientes desse último. Resultados similares foram encontrados por pesquisadores ao estudarem isolados de *Verticillium* obtidos de diferentes hospedeiros (Aparecido & Finatti, 2012).

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* apresentou-se sensível no controle deste com o uso do óleo essencial de melaleuca na concentração 0,8%, conforme (Ramos et al., 2016). Segundo Steffen, Maldaner, Steffen, Missio & Mezzomo (2019), o óleo essencial de melaleuca apresentou ação antifúngica sobre o crescimento *in vitro* de *S. sclerotiorum* e *Fusarium* spp., inibindo totalmente o desenvolvimento do micélio de ambos os fitopatógenos na concentração de 0,5%.

Ensaio 2: Efeito do óleo essencial de melaleuca (*M. alternifolia*) sobre o IVCM

O óleo essencial de melaleuca reduziu significativamente o crescimento micelial de *Stemphylium* sp. A redução do crescimento micelial medido pelo IVCM em função da concentração do

óleo de melaleuca foi melhor ajustada ao modelo quadrático (Figura 1).

Segundo Martins et al. (2010), a inibição do crescimento micelial em função das concentrações do óleo de melaleuca foram melhores ajustadas ao modelo quadrático, inferindo que a concentração que melhor se ajustou no controle dos fungos fitopatogênicos foi de 0,4%, contribuindo para um menor índice de crescimento micelial dos fungos testados (Figura 2).

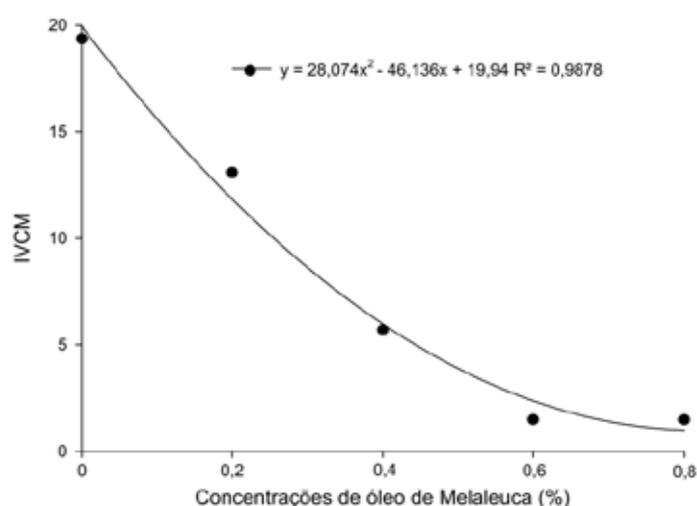


Figura 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Stemphylium* sp., isolados de cebola, em função de diferentes concentrações de óleo de melaleuca. IFTM, Uberlândia, 2017.

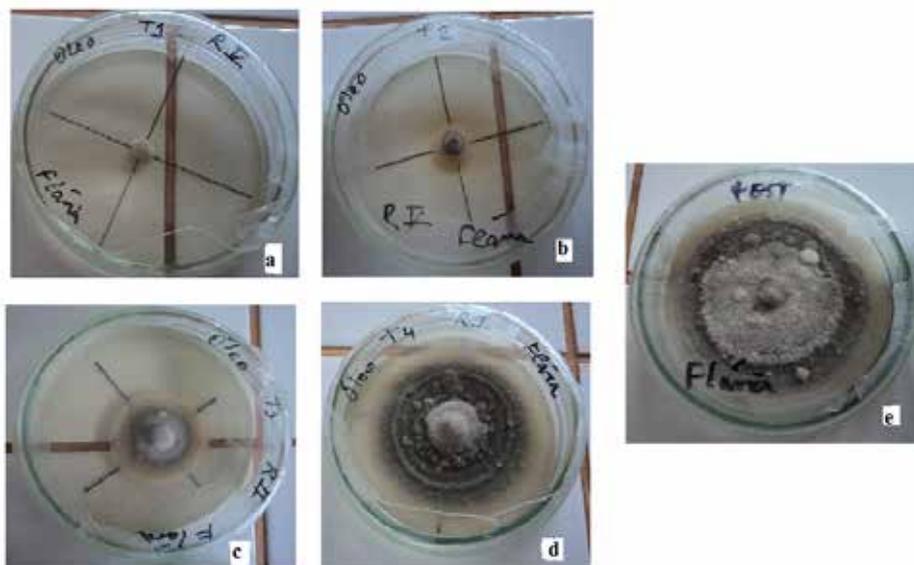


Figura 2. Tratamentos com diferentes concentrações em BDA + óleo de melaleuca em que: a) 0,8%; b) 0,6%; c) 0,4%; d) 0,2%; e) Testemunha. IFTM, Uberlândia, 2017. (Foto de autoria própria).

A partir do IVCM foi realizada comparação de médias para melhor distinção das concentrações utilizadas do óleo de melaleuca (Tabela 2).

O menor IVCM foi observado nas concentrações de 0,8% e 0,6%, seguido pelas concentrações de 0,4% e 0,2%, que diferiram entre si e das maiores concentrações aplicadas. Todas as concentrações apresentaram efeito na redução do IVCM em relação à testemunha sem a adição do óleo de melaleuca ao meio de cultura.

A sensibilidade de fungos ao óleo de melaleuca a baixas concentrações já era conhecido. *A. alternata*, *M. phaseolina* e *S. sclerotiorum* apresentaram sensibilidade ao óleo de melaleuca na concentração de 0,2% *in vitro* (Martins et al., 2010).

In vivo, houve o controle de *B. cinerea* em folhas de repolho em concentrações acima de 1,6% (Bishop & Reagan, 1998) e de *Cercospora beticola* a partir de

0,67% de concentração do óleo (Souza et al., 2015). Concha, Moore e Hoolloway (1998), relataram que o óleo de melaleuca no controle contra *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, entre outros e obtiveram uma atividade antimicrobiana significativa, sugerindo que o óleo pode ser útil no tratamento de doenças fúngicas.

Outros trabalhos também apresentaram inibição do crescimento micelial de *Penicillium sp.* com o uso do óleo de melaleuca, a exemplo de Chidi, Bouhoudan & Khaddor (2020). Hammer et al. (2004), relataram a atividade fungistática e fungicida do óleo em dermatófitos e fungos filamentosos, enquanto que Papadopoulos, Carson, Hammer & Riley (2006) relataram atividade semelhante em *Pseudomonas spp.*, onde a concentração mínima inibitória encontrada nos tratamentos com o óleo de *Melaleuca sp.* foi de 2,0%.

Tabela 2. Efeito do óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre a média do índice de velocidade média de crescimento (IVCM) de *Stemphylium sp.* isolado de cebola. IFTM, Uberlândia, 2017.

Tratamento	IVCM (cm)	
Óleo de <i>M. alternifolia</i> (0,8%)	1,48±	a
Óleo de <i>M. alternifolia</i> (0,6%)	1,49±	a
Óleo de <i>M. alternifolia</i> (0,4%)	4,56±	b
Óleo de <i>M. alternifolia</i> (0,2%)	13,09±	c
Testemunha	19,36±	d
CV (%) =	17,77	
Média geral =	7,99	
Erro padrão médio=	0,6352	

Quanto ao mecanismo de ação antifúngica do óleo essencial de melaleuca destaca-se a alteração na permeabilidade da membrana, afetando tanto a membrana plasmática como a mitocondrial (Carson et al., 2006) levando-se, nesse caso, à inibição da respiração mitocondrial. Segundo Cox et al., (2000) há a possibilidade do óleo essencial de *Melaleuca* atuar diretamente em enzimas respiratórias. Outros estudos apontam que o óleo inibe a formação do tubo germinativo, ou a conversão micelial afetando dessa forma o desenvolvimento e o crescimento do fungo (Carson et al., 2006).

A determinação da atividade biológica desses componentes presentes nos óleos essenciais, com relação ao efeito antimicrobiano, pode favorecer o desenvolvimento de novas moléculas químicas, fundamentais para o manejo de doenças de plantas, reduzindo o aparecimento de microrganismos resistentes, bem como a contaminação do meio ambiente.

Desta forma, pode-se afirmar que o óleo essencial utilizado, possui efeito fungicida no controle do *Stemphylium* spp. *in vitro*, o que pode estar relacionado à presença de componentes majoritários em sua composição química, como o terpinem 4-ol (Vieira, Barbosa, Maltha, Paula & Nascimento, 2004).

CONCLUSÕES

O meio de cultura a base de suco de tomate a 20% obteve um crescimento micelial de 71,08 cm aos 10 dias e 84,10 cm aos 15 dias, seguido do meio de cultura BDA com crescimento micelial de 65,41 cm aos 10 dias e 90,02 cm aos 15 dias.

Os tratamentos nas concentrações de 0,8% e 0,6% do óleo essencial de melaleuca apresentaram melhor eficiência no controle de *Stemphylium* sp. *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas, A. C. & Mafia, R. G (Eds). (2016). *Métodos em fitopatologia*. (2º ed). Viçosa: UFV.

Aparecido, C. C. & Finatti, D. (2012). *Variabilidade patogênica de isolados de Verticillium obtidos de diferentes hospedeiros*. São Paulo: Governo do estado de São Paulo, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, 1-6. (Documento técnico 014).

Ávila, Z. R., Mello, S. C. M., Ribeiro, Z. M. A. & Fontes, E. M. G. (2000). Produção de inóculo de *Alternaria cassiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(3), 533-541.

Bishop, C. D. & Reagan, J. (1998). Control of storage pathogen *Botrytis cinerea* on dutch white cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) by the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Essential Oil Research*, 10(1), 57-60.

Carson, C. F., Hammer, K. A. & Riley. T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 50-62.

Castellani, A. (1939). Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(2), 225-226.

Castelo, A. V. M., Afonso, S. R., De Melo, R. R., Del Menezzi, C. H. S., Camillo, J. & Vieira, R. F. (2013). Rendimento e composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell, na região do Distrito Federal. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 8(1), 143-147.

Concha, J. M., Moore, L. S. & Holloway, W. J. (1998). Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea-tree) oil against various pathogenic organisms. *Journal American Pediatric Medical Association*, 88(10), 489-92.

Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170-175.

Chidi, F., Bouhoudan, A. & Khaddor, M. (2020). Antifungal effect of the tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium verrucosum*. *Journal of King Saud University - Science*, 32(3), 2041-2045.

Cramer, C. S. (2000). Breeding and genetics of Fusarium basal rot resistance in onion. *Euphytica*, 115(3), 159-166.

Dias, I. E. (2012). *Crescimento micelial e produção de toxinas por fungos de armazenamento associados a grãos de milho sob diferentes níveis de restrição hídrica* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1995). *Basic plant pathology methods*. Boca Raton: CRC Press.

Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous hyphomycetes. X. *Mycological Papers*, 125, 1-30.

Fancelli, M. I. (1991). *Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de Alternaria solani do tomate e da batata e variabilidade patogênica de A. solani f. sp. lycopersici N. F.* (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo.

Ferreira, D. F. (2000). *Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas*. Lavras: UFLA.

Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riley, T. V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), 1081-1085.

Leão, E. U., Santos, G. R. dos, Sarmento, R. A., Reis, M. R. dos & Chagas Júnior, A. F. (2012). Crescimento micelial e produção de conídios de *Ascochyta cucumis* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. *Bioscience Journal*, 28(2), 325-331.

- Santos Martins, J. A. S., Sagata, E., Araújo Santos, V. A. & Juliatti, F. C. (2010). Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungos fitopatogênicos. *Bioscience Journal*, 27(1), 49-51.
- Marinelli, E., Orzali, L., Lotti, E. & Riccioni, L. (2012). Activity of some essential oils against pathogenic seed borne fungi on legumes. *Asian Journal of Plant Pathology*, 6(3), 66-74.
- Miller, M. E. & Lacy, M. L. (1995). Purple blotch. In: H. F. Schwartz, S. K. Mohan (Eds.), *Compendium of onion and garlic diseases* (pp. 23-24). APS Press.
- Miller, P. M. (1955). V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology*, 45(8), 461-462.
- Ministerio de Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2018). *AGROFIT : Sistemas de agrotóxicos fitossanitários*. Recuperado de http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- Papadopoulos, C. J., Carson, C. F., Hammer, K. A. & Riley, T. V. (2006). Susceptibility of pseudomonads to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and components. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), 449-451.
- Ramos, K., Andreani Junior, R. & Kozusny-Andreani, D. I. (2016). Óleos essenciais e vegetais no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(2), 605-612.
- Steffen, G. P. K., Maldaner, J., Steffen, R. B., Missio, E. L. & Mezzomo, R. (2019). Controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium sp.* com óleo essencial de melaleuca. *Enciclopédia Biosfera*. (Vol. 16. No. 30). Goiânia: Centro Científico Conhecer.
- Souza, A. D., Roggerio, T. U, Furlan, M. R. & Aoyama, E. M. (2015). Óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche, Cheel) no controle de cercosporiose em beterraba. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(4), 1078-1082.
- Suheri, H. & Price T. V. (2000a). Infection by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* on onion leaves and disease development under controlled environments. *Plant Pathology*, 49(3), 377-384.
- Suheri, H. & Price T. V. (2000b). Stemphylium leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 29(3), 192-199.
- Suheri, H. & Price T. V. (2001). The epidemiology of purple leaf blotch on leeks in Victoria. *European Journal of Plant Pathology*, 107(5), 503-510.
- Trajano, V. N. & Santos, B. H. C. (2009). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Brazilian archives of biology and technology*, 52(1), 45-50.
- Teixeira, H., Chitarra, L. G., Arias, S. M. S. & Machado, J. C. (2001). Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. *Ciência e Agrotecnologia*, 25(6), 1314-1320.
- Vieira, T. R., Barbosa, L. C. A., Maltha, C. R. A., Paula, V. F. & Nascimento, E. A. (2004). Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Química Nova*, 27(4), 536-539.