



Essential oil of clove (*Syzygium aromaticum*) to control *Sclerotium rolfsii* *in vitro*

Óleo Essencial de Cravo (*Syzygium aromaticum*) no controle *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*

Tiago Silva Lima*¹, Kevison Romulo da Silva França², Jackeline Laurentino da Silva³, Alex Béu Santos⁴, Jaqueline Figueredo de Oliveira Costa⁵, Tiago Augusto Lima Cardoso⁶

Abstract: Essential oils can inhibit growth of several phytopathogenic fungi of agricultural concern, such as *Sclerotium* spp. which causes root and collar rots, hampering the absorption of water and nutrients. Natural oils have short persistence in the environment and low toxicity, comprising compounds safer than conventional agrochemicals. Within the context of integrated management of diseases, essential oils may benefit the health of farmers, consumers and the environment. This study evaluated the *in vitro* inhibitory effect of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil on the mycelial growth of *Sclerotium rolfsii*. The experimental design was completely randomized, with 7 treatments (5 oil concentrations, 1 negative control, and 1 positive control) and five replications, with the experimental unit constituted by a Petri dish. The treatments consisted of different oil concentrations (0.0125; 0.025; 0.05; 0.1 and 0.2%) of clove essential oil, a negative control (0.0%) and a positive control, fungicide Tiram (1 mL L⁻¹). The essential oil and the fungicide Tiram were merged into the synthetic Potato-Dextrose-Agar (PDA) culture medium. The plates were inoculated with the pathogen *S. rolfsii* and incubated for seven days at 25 ± 2 °C. We compared the treatments through the percentage of mycelial growth inhibition (PGI) and the mycelial growth velocity index (MGVI). Increasing oil concentration significantly reduced the mycelial growth of *S. rolfsii* and paralyzed mycelial growth at 0.1% concentration. The effect of clove essential oil was similar to the commercial fungicide.

Key words: Alternative control. Natural fungicide. Plant diseases.

Resumo: A utilização de óleos essenciais inibe o crescimento de diversos fungos fitopatogênicos causadores de prejuízos à agricultura, por exemplo, os fungos do gênero *Sclerotium* causam podridão em raízes e colo de plantas, comprometendo a absorção de água e nutrientes. Os óleos essenciais têm curta persistência no meio ambiente e baixa toxicidade, sendo formados por compostos mais seguros que os defensivos químicos convencionais. No manejo integrado de doenças, esses óleos podem beneficiar a saúde dos produtores e consumidores e o meio ambiente. Dessa forma, objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito de concentrações do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*, *in vitro*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos (5 concentrações do óleo, 1 testemunha negativa e 1 testemunha positiva) em cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma placa de Petri. Os tratamentos consistiram em diferentes concentrações (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2%) do óleo essencial de *S. aromaticum*, um controle negativo (0,0%) e um controle positivo, fungicida Tiram (1 mL L⁻¹). Os tratamentos foram incorporados ao meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) sintético. As placas foram inoculadas com o patógeno *S. rolfsii* e incubadas por 7 dias a 25 ± 2 °C. Para verificar a diferença entre os tratamentos, foi estimada a porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) e o índice da taxa de crescimento micelial (IVCM). O crescimento micelial de *S. rolfsii* foi reduzido significativamente com o aumento das concentrações, sendo paralisado na concentração 0,1% do óleo essencial. O óleo essencial de *S. aromaticum* teve efeito semelhante ao obtido pelo fungicida comercial.

Palavras-chave: Controle alternativo. Fungicida natural. Doenças de plantas.

*Corresponding author

Submitted for publication on 25/11/2021, approved on 12/03/2021 and published on 23/04/2022

¹Doutorando em Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: lima_tiago92@outlook.com;

²Doutorando em Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: kevsfranca@gmail.com;

³Doutoranda em Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: jackeline.laurentino@outlook.com;

⁴Mestrando em Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: alexbeuagronomo@gmail.com;

⁵Professora Doutora, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Rio Largo – AL, Brasil. E-mail: jaquelinefigueredo@hotmail.com;

⁶Professor Doutor, Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Pombal, PB, Brasil. E-mail: tiagoipj@yahoo.com.br

INTRODUCTION

Plant pathogenic fungi cause significant losses to global agricultural production (BRZEZINSKA, 2014). The genus *Sclerotium* is considered one of the main plant pathogens due to its wide geographical distribution and high host diversity, with more than 200 plant species, belonging to approximately 100 botanical families (AMORIM *et al.*, 2016).

Species from the genus *Sclerotium* cause root rot and stem rot in various plants. Damages caused to plant roots jeopardize water and nutrient absorption, hampering crop development (AMORIM *et al.*, 2018). These pathogens are responsible for significant losses in harvests around the entire globe (FRANKE *et al.*, 1998; PAPARU *et al.*, 2018). One important characteristic of the pathogen is the production of sclerotium, a resistance structure for fungal survivor during long periods in the soil under unfavorable conditions (YAQUB; SHAHZAD, 2011). Variables such as high humidity and temperature contribute to the pathogen's development, causing huge damages due to its difficult control (AMORIM *et al.*, 2018).

In the field, problems caused by plant pathogens are usually minimized by the conventional production system (MARIANI *et al.*, 2015). This system is based in the application of mineral fertilizers and agrochemicals, which if incorrectly used, cause biological and ecological imbalance (TAKESHITA *et al.*, 2014), in addition to human health problems (SHEAHAN *et al.*, 2017).

Chemical control for soil inhabiting plant pathogens is commonly ineffective, increasing costs and contaminating the environment, as well as damaging the micro flora (BETTIOL; MORANDI, 2009). The indiscriminate and inadequate use of these products may also promote the selection of resistant pathogenic agents, forcing the utilization of gradually stronger agrochemicals (SILVA *et al.*, 2012). The result of this management system are: the increase of production costs (PERINA *et al.*, 2015), environmental pollution (SILVA *et al.*, 2013) and the presence of great quantities of chemical residues in food, which may restrict exportation of agriculture *commodities* (BALLESTE *et al.*, 2020).

INTRODUÇÃO

Os fungos fitopatogênicos ocasionam prejuízo significativo na produção agrícola mundial (BRZEZINSKA, 2014). O gênero *Sclerotium* é considerado um dos principais, devido à ampla distribuição geográfica e à grande diversidade de hospedeiros, constituída por mais de 200 espécies de plantas, pertencentes a aproximadamente 100 famílias botânicas (AMORIM *et al.*, 2016).

As espécies do gênero *Sclerotium* causam podridão em raízes e colo de plantas. Os danos provocados às raízes comprometem a absorção de água e nutrientes, prejudicando o desenvolvimento das culturas (AMORIM *et al.*, 2018). Esses patógenos são responsáveis por perdas significativas de diferentes safras em todo mundo (FRANKE *et al.*, 1998; PAPARU *et al.*, 2018). Uma característica importante são os escleródios, estruturas de resistência que garantem a sobrevivência do fungo em condições desfavoráveis por longos períodos no solo (YAQUB; SHAHZAD, 2011). Fatores como umidade e temperatura elevadas contribuem para o desenvolvimento do patógeno, provocando grandes prejuízos decorrentes do difícil controle (AMORIM *et al.*, 2018).

No campo, os problemas ocasionados por fitopatógenos são comumente minimizados por meio do sistema convencional de produção agrícola (MARIANI *et al.*, 2015). Esse sistema baseia-se no emprego de fertilizantes minerais e defensivos, que, se utilizados incorretamente, provocam desequilíbrios biológicos e ecológicos (TAKESHITA *et al.*, 2014), além de complicações à saúde humana (SHEAHAN *et al.*, 2017).

O controle químico para patógenos habitantes do solo geralmente é ineficaz, aumentando os gastos, contaminando o ambiente e destruindo a microflora (BETTIOL; MORANDI, 2009). A utilização indiscriminada e inadequada desses produtos também pode proporcionar a seleção de agentes patogênicos resistentes, sendo necessária a aplicação gradativa de agroquímicos mais fortes (SILVA *et al.*, 2012). O resultado desse manejo são: maior custo de produção (PERINA *et al.*, 2015), poluição do meio ambiente (SILVA *et al.*, 2013) e presença de grande quantidade de resíduos em alimentos, o que pode limitar a exportação dessas *commodities* agrícolas (BALLESTE *et al.*, 2020).

Research on natural products considered toxic to fungi has been developed, evaluating their efficiency in the management of plant pathogens and products less aggressive to the environment, animals and humans (LIMA *et al.*, 2019). Essential oils fit within these parameters as a promising alternative, once they are natural products constituted by complex compounds produced from secondary metabolites from plants (BIZZO *et al.*, 2009), showing low toxicity levels to humans (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Properties from the essential oil from clove (*Syzygium aromaticum* L.) has been studied by various researchers, and its biological activities, including anti-fungal activity, were documented in the scientific literature. The main constituents from this oil are eugenol (70-90%), acetyleugenol (5-15%) and β -caryophyllene (up to 2.1%) (ROJAS *et al.*, 2014). Studies reported promising results to control *Rhizoctonia solani* (COSTA *et al.*, 2011), *Fusarium verticillioides* and *Macrophomina* spp. (LIMA *et al.*, 2019) when using essential oils from clove.

The utilization of essential oils promoted the inhibition of various species of fungi, with low toxicity and persistence in the environment, proportioning advantages to farmers and consumers of agricultural products. Although the essential oil from clove has been studied in various plant pathogens, there are no literature reference for *S. rolfsii* as defining the minimum inhibitory concentration (MIC) and comparing the effects with a commercial fungicide, therefore justifying the present study. Thus, the objective of the present work was to verify the effect of the essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Sclerotium rolfsii* mycelial growth.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was performed at the Plant Pathology Laboratory from the Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar (CCTA) from the Federal University of Campina Grande (UFCG), in the municipality of Pombal, Paraíba, Brazil.

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com substâncias naturais consideradas fungitóxicas visando avaliar sua eficiência no manejo de patógenos prejudiciais às culturas e, também, menos agressivos ao meio ambiente e à saúde humana e animal (LIMA *et al.*, 2019). Os óleos essenciais se enquadram nesses requisitos como alternativa promissora, pois são produtos naturais, constituídos por compostos complexos gerados a partir de metabólitos secundários das plantas (BIZZO *et al.*, 2009), que apresentam baixa toxicidade a humanos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

As propriedades do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) têm sido estudadas por diversos pesquisadores, e suas atividades biológicas, incluindo a atividade antifúngica, foram documentadas na literatura. Os principais constituintes desse óleo são o eugenol (70-90%), acetato de eugenol (5-15%) e β -cariofileno (até 2,1%) (ROJAS *et al.*, 2014). Diversos estudos relataram resultados promissores no controle de *Rhizoctonia solani* (COSTA *et al.*, 2011), *Fusarium verticillioides* e *Macrophomina* spp. (LIMA *et al.*, 2019) quando utilizaram o óleo de cravo-da-índia.

A aplicação de óleos essenciais proporciona o controle inibitório de várias espécies de fungos, com baixa persistência no ambiente e toxicidade, propiciando vantagens à saúde dos produtores e consumidores de produtos agrícolas. Embora o óleo essencial de cravo-da-índia tenha sido muito estudado com outros patógenos, não há relatos com *S. rolfsii* definindo a concentração inibitória mínima (CIM) e comparando com fungicida comercial. Por ser uma estratégia alternativa inovadora para empregar no manejo do patógeno, justifica-se o presente estudo. Assim, objetivou-se verificar o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* no crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar (CCTA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no município de Pombal, Paraíba.

The isolate used in the experiment was obtained from the collection of plant pathogens from the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), preserved in distilled water by the method of Castellani until its utilization. The essential oil from clover (*Syzygium aromaticum*) was purchased from a store specialized in natural products.

The experiment was performed under completely randomized design, with five replicates. Treatments consisted of five concentrations of *Syzygium aromaticum* pure essential oil (0.0125; 0.025; 0.05; 0.1 and 0.2%), one negative control without essential oil (0%) and one positive control using the commercial fungicide Tiram® 200 SC at the recommended concentration by the manufacturer (1 mL L⁻¹). Oil concentrations were used according the literature (SANTOS *et al.*, 2007). In order to obtain the final concentrations the method of direct dilution in culture medium was used (PEREIRA *et al.*, 2006).

Treatments were incorporated to the culture medium PDA (Potato Dextrose Agar) autoclaved and melted (46-48 °C). After cooling the medium was poured into 9 cm diameter Petri dishes under aseptic conditions. After solidified, mycelium disks with 1 cm diameter containing the fungal mycelium were removed from the margins of colonies with 7 days growth and were transferred into the center of each plate containing the respective treatments. Then, plates were wrapped in plastic film and incubated in B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) chamber at 27±2 °C temperature and 12 h photoperiod.

Colony growth was measured daily for 7 days or until complete cover of the culture medium surface, evaluating the diameter of the colony through the mean value from two perpendicular measures obtained with a digital caliper. The results were submitted to the calculation of the percentage of mycelial growth inhibition (PGI) and the mycelial growth velocity index (MGVI) (Equations 1 and 2).

O isolado utilizado no experimento, proveniente da coleção de fitopatógenos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), foi preservado em água destilada pelo método de Castellani até a sua utilização. O óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) foi adquirido em loja especializada em produtos naturais.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos consistiram em cinco concentrações de óleo essencial de *S. aromaticum* puro (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2%), uma testemunha negativa sem suplementação de óleo essencial (0%) e uma testemunha positiva suplementada com o fungicida Tiram® 200 SC na concentração recomendada pelo fabricante (1 mL L⁻¹). As concentrações do óleo foram obtidas da literatura (SANTOS *et al.*, 2007). Para obter as concentrações finais, utilizou-se o procedimento de diluição direta em meio de cultura (PEREIRA *et al.*, 2006).

Os diferentes tratamentos foram incorporados ao meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) autoclavado e fundente (46-48 °C). Após resfriamento, o meio foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro em condições assépticas. Após a solidificação, discos de micélio com 1 cm de diâmetro contendo micélios do fungo, foram removidos da margem de colônias com 7 dias de crescimento e foram transferidos para o centro de cada placa contendo os tratamentos. Em seguida, as placas foram envolvidas em plástico filme e incubadas em estufa do tipo B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) à temperatura de 27±2 °C e fotoperíodo de 12 h.

O crescimento das colônias foi mensurado diariamente por 7 dias ou até a completa cobertura da superfície do meio de cultura, avaliando-se o diâmetro das colônias, obtida por meio da média de duas medidas perpendiculares, utilizando paquímetro digital. Os resultados foram submetidos ao cálculo da porcentagem de inibição micelial (PIC) e ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (Equações 1 e 2).

$$PGI = \frac{(\text{Control growth} - \text{Treatment growth}) \times 100}{\text{Control growth}} \quad (\text{Eq. 01})$$

$$MGVI = \sum \frac{\text{Actual mean diameter} - \text{Previous mean diameter}}{\text{Number of days after inoculation}} \quad (\text{Eq. 02})$$

Concentrations of the essential oil for inhibition and the fungus growth response were adjusted to the quadratic-plateau regression model. The hypothesis of the parameters of the model generated significantly differ from zero was tested by the T test. In order to test differences between treatments with essential oil and the treatment containing commercial fungicide, multiple comparisons were applied by the Mann-Whitney test. Non-parametric tests were used due to the absence of variation in the results from some treatments. Differences with values under 5% were considered significant. Regressions were performed using the software R Core Team 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018).

As concentrações do óleo essencial na inibição e a resposta em crescimento do fungo foram ajustadas ao modelo de regressão quadrático com platô. A hipótese de que os parâmetros do modelo gerado diferem significativamente de zero foi testada aplicando-se o teste T. Para testar a diferença entre os tratamentos com o óleo essencial e o tratamento contendo o fungicida, foram aplicadas comparações múltiplas pelo teste Mann-Whitney. Testes não-paramétricos foram utilizados devido à ausência de variação nos resultados de alguns tratamentos. Diferenças com valores de probabilidade abaixo de 5% foram consideradas significativas. As regressões foram realizadas no programa R Core Team 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018).

RESULTS AND DISCUSSION

All *S. aromaticum* essential oil concentrations tested reduced the mycelial growth and the growth rate of *S. rolfsii*. Using the equation generated by the regression with the quadratic-plateau model, the different concentrations of *S. aromaticum* essential oil were compared. The inhibition percentage improved as the concentration increased. Concentrations of 0.1 and 0.2% inhibited 100% of *S. aromaticum* mycelial growth. All other concentrations (0.0125; 0.025 and 0.05%) also showed inhibitory activity at 23.09; 36.43 and 58.26%, respectively (Figure 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as concentrações testadas do óleo essencial de *S. aromaticum* reduziram o crescimento micelial e a taxa de crescimento de *S. rolfsii*. Utilizando a equação gerada pela regressão com o modelo platô-quadrático, compararam-se as diferentes concentrações do óleo essencial de *S. aromaticum*. A porcentagem de inibição cresceu conforme o aumento na concentração. As concentrações (0,1 e 0,2%) inibiram 100% do crescimento micelial de *S. rolfsii*. As demais concentrações (0,0125; 0,025 e 0,05%) também apresentaram atividade antifúngica, 23,09; 36,43 e 58,26%, respectivamente (Figura 1).

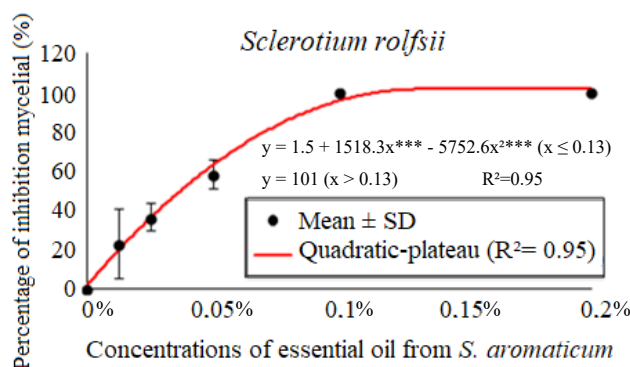


Figure 1 - Percentage of inhibition in *S. rolfsii* mycelial growth using *S. aromaticum* essential oil.

*** $P < 0.01$, T test.

Figura 1 - Porcentagem de inibição do óleo essencial de *S. aromaticum* sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii*.

*** $P < 0,01$, teste T.

The phenolic compound known as eugenol is the main component in the essential oil from *S. aromaticum*, in addition to β -caryophyllene, α -humulene, caryophyllene oxide, and acetyleugenol, at lower concentrations (ROJAS *et al.*, 2014), which grant anti-fungal characteristics to the essential oil (RAMOS *et al.*, 2016). The mechanism of action of the essential oil from *S. aromaticum* is associated with its hydrophobicity, which promotes interaction with the cell wall and the lipids from the cell membrane and mitochondria, modifying cell permeability and producing disturbances on membrane structure (LIMA *et al.*, 2019).

Total inhibition of *S. rolfsii* mycelial growth was obtained at a concentration of 0.1% essential oil. Such concentration was able to completely inhibit the pathogen's growth. Below this, we have the minimum inhibiting concentration observed (MICobs = 0.1%; Table 1). Deriving the equation we have the point of maximum response, estimated MIC (MICest = 0.132%; Table 1), slightly superior to MICobs.

O composto fenólico eugenol é o constituinte primordial do óleo essencial de *S. aromaticum*, além do β -cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno e acetato de eugenil, em menores concentrações (ROJAS *et al.*, 2014), os quais garantem sua capacidade antifúngica (RAMOS *et al.*, 2016). O mecanismo de ação do óleo de *S. aromaticum* está correlacionado à sua hidrofobicidade, que promove interação com a parede e os lipídios da membrana celular e mitocôndrias, modificando a permeabilidade celular e acarretando distúrbios em suas estruturas (LIMA *et al.*, 2019).

A inibição total do crescimento micelial do *S. rolfsii* foi obtida com a concentração de 0,1% do óleo de *S. aromaticum*. Essa concentração foi capaz de inibir totalmente o crescimento do patógeno avaliado. Abaixo, tem-se a concentração inibitória mínima observada (CIMobs = 0,1%; Tabela 1). Derivando-se a equação, tem-se o ponto de máxima resposta, CIM estimada (CIMest = 0,132%; Tabela 1), ligeiramente superior à CIMobs.

Table 1 - Determination of the minimum inhibition concentration of *S. aromaticum* essential oil against *S. rolfsii* and mean values for mycelial growth (% \pm SD) of *S. rolfsii* at different concentrations of essential oil and control treatment

Tabela 1 - Determinação da concentração inibitória mínima de óleo essencial de *S. aromaticum* contra *S. rolfsii* e médias da inibição de crescimento micelial (% \pm DP) de *S. rolfsii* nas diferentes concentrações do óleo essencial e do tratamento controle

Concentrations	MICobs ¹	MICest ²	Mean \pm Standard Deviation
0.0%			0.00 \pm 0.00 d ³
0.0125%			23.09 \pm 16.06 c
0.025%			36.43 \pm 6.29 c
0.05%			58.26 \pm 6.73 b
0.1%	0.1	0.132	100.00 \pm 0.00 a
0.2%			100.00 \pm 0.00 a
Tiram			100.00 \pm 0.00 a

¹ Minimum inhibition concentration determined in tests *in vitro*. ² Minimum inhibition concentration estimated by the regression analysis, quadratic-plateau model. ³ Same letters within the column represent no significant differences by the Mann-Whitney test.

¹ Concentração inibitória mínima determinada em teste *in vitro*. ² Concentração inibitória mínima estimada pela análise de regressão no modelo platô-quadrático.

³ Letras iguais, na coluna, não apresentam diferença significativa de acordo com o teste Mann-Whitney.

Many researchers have obtained inhibitory results for fungal growth on different plant pathogens when using the essential oil from clove under *in vitro* conditions. Sharma *et al.* (2016), while studying the oil from *S. aromaticum*, observed total reduction of mycelial growth of a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate at a concentration of 125 ppm (0.1%) of essential oil. Lima *et al.* (2019), while evaluating the control of some fungal pathogens, verified total inhibition of the mycelial growth in *F. verticillioides* at a concentration of 0.05 and at 0.1% for both *Macrophomina phaseolina* and *M. pseudophaseolina* using *S. aromaticum* essential oil. In addition to evidence the anti-fungal potential of *S. aromaticum* essential oil, the results from these studies suggest the required concentration to inhibit mycelial growth *in vitro* will depend of the microorganism evaluated, justifying research the minimum concentration required in different plant pathogens of economic importance.

In order to verify the potential of *S. aromaticum* essential oil as a fungicide against *S. rolfsii*, its fungitoxic effect was compared with that obtained from a commercial synthetic fungicide. It was verified no significant difference occurred between the essential oil at concentrations of 0.1 and 0.2% and the commercial fungicide, with 100% of mycelial growth inhibition. The lower concentrations of essential oil differed statistically resulting in lower percentages of inhibition. Strong inhibition effect against *S. rolfsii* was observed in the essential oil at 0.1% when compared to the commercial fungicide (Table 1). This result suggests that under *in vitro* conditions, the commercial fungicide may be substituted by the essential oil.

Using essential oils from different plant species to control *S. rolfsii*, Kottearachchi *et al.* (2012) verified total inhibition of the mycelial growth in *Eucalyptus grandis*, *E. microcorys* and *E. robusta* at concentrations of 0.1; 0.5 and 0.5%, respectively. Evaluating the fungitoxic effect from *Cymbopogon martinii* essential oil on *S. rolfsii* mycelial growth, Xavier *et al.* (2020) verified total inhibition starting at a concentration of 0.05%. Thus, different studies have verified the anti-fungal activity from different essential oils, demonstrating their efficiency as an alternative control against *S. rolfsii*, in addition to suggest the concentration required to inhibit the development of the pathogen under *in vitro* conditions, will depend on the essential oil used.

Muitos autores obtiveram resultados inibitórios no crescimento fúngico de diferentes patógenos usando o óleo essencial de cravo-da-índia em condições *in vitro*. Sharma *et al.* (2016), estudando o óleo de *S. aromaticum*, obteve redução total do crescimento micelial do isolado *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* com a concentração 125 ppm (0,1%). Lima *et al.* (2019), avaliando o controle de alguns patógenos fúngicos, alcançaram inibição total do crescimento micelial de *F. verticillioides* com a concentração de 0,05 e 0,1% para *Macrophomina phaseolina* e *M. pseudophaseolina*, respectivamente, utilizando o óleo de *S. aromaticum*. Além de comprovar o potencial antifúngico do óleo essencial de *S. aromaticum*, os resultados desses estudos sugerem que a concentração necessária para inibir o crescimento micelial em condições *in vitro* dependerá do microrganismo avaliado, justificando a investigação da concentração mínima em outros fitopatógenos de importância econômica.

Para entender o potencial do óleo essencial de *S. aromaticum* como fungicida contra *S. rolfsii*, comparou-se seu efeito fungitóxico com aquele obtido por um fungicida sintético comercial. Constatou-se não haver diferença significativa entre as concentrações 0,1 e 0,2% e o fungicida sintético comercial, que apresentaram 100% da porcentagem de inibição do crescimento micelial. Enquanto as menores concentrações do óleo diferiram estatisticamente obtendo as menores porcentagens de inibição. Observou-se forte efeito de inibição do óleo em relação ao fungicida na concentração 0,1% para *S. rolfsii* (Tabela 1). Este resultado sugere que, sob condições *in vitro*, o fungicida pode ser substituído pelo óleo essencial.

Usando o óleo essencial de outras espécies vegetais no controle de *S. rolfsii*, Kottearachchi *et al.* (2012) obtiveram inibição total de crescimento micelial nas espécies *Eucalyptus grandis*, *E. microcorys* e *E. robusta* nas concentrações 0,1; 0,5 e 0,5%, respectivamente. Avaliando o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Cymbopogon martinii* sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii*, Xavier *et al.* (2020) constataram inibição total a partir da concentração 0,05% do óleo de *C. martinii*. Diante disso, os diferentes estudos verificaram a atividade antifúngica dos distintos óleos, comprovando a eficiência do controle alternativo contra *S. rolfsii*, além de sugerir que a concentração necessária para inibir o desenvolvimento do patógeno em condições *in vitro* irá depender do óleo essencial a ser empregado.

Reduction of MGVI was observed as the concentration of the *S. aromaticum* essential oil increased, until *S. rolfsii* growth was interrupted when submitted to its respective MICObs (Table 1). Differences between the control and essential oil concentration of 0.0125, 0.025 and 0.05% were verified. Negative control showed the highest velocity of mycelial growth 0.8 cm day^{-1} , followed by concentrations of 0.0125, 0.025 and 0.05% with MGVI of 0,60; 0,50 e 0,33 cm day^{-1} , respectively. There was no difference between essential oil concentrations of 0.1 and 0.2% and commercial fungicide, without mycelial growth in de *S. rolfsii* (Figure 2).

A redução do IVCm foi observada com o aumento das concentrações do óleo essencial de *S. aromaticum* até o crescimento de *S. rolfsii* ser interrompido, quando submetido a sua respectiva CIMObs (Tabela 1). Verificou-se diferença entre controle negativo e as concentrações 0,0125, 0,025 e 0,05% do óleo. O controle negativo apresentou a maior velocidade do crescimento micelial $0,8 \text{ cm dia}^{-1}$, seguido das concentrações 0,0125, 0,025 e 0,05% com os seguintes IVCm ($0,60$; $0,50$ e $0,33 \text{ cm dia}^{-1}$), respectivamente. Não houve diferença entre 0,1 e 0,2% e o fungicida comercial, não ocorrendo crescimento micelial de *S. rolfsii* (Figura 2).

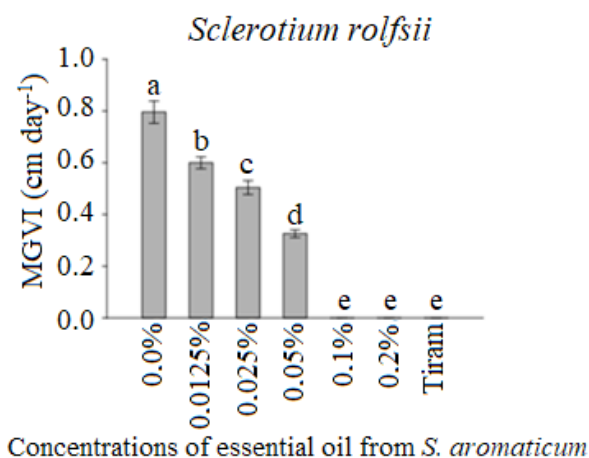


Figure 2 - Mycelial growth velocity index (MGVI) of *S. rolfsii* at different concentrations of essential oil from *S. aromaticum* and control treatments.

* Equal letters do not differ by the Mann-Whitney test ($P \leq 0,05$).

Figura 2 - Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) de *S. rolfsii* nas diferentes concentrações do óleo essencial de *S. aromaticum* e tratamentos de controle.

* Letras iguais não diferem pelo teste Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

The results from this study suggest the possibility of an alternative strategy to control *Sclerotium rolfsii*, once the pathogen shows wide geographical distribution and vast diversity of hosts such as peanuts, beans, soya and tomato (TOMAZELI *et al.*, 2011; HENNING *et al.*, 2014; AMORIM *et al.*, 2016; AMORIM *et al.*, 2018; GASPAROTTO *et al.*, 2019), being accountable for significant losses in the whole planet (FRANKE *et al.* 1998; PAPARU *et al.* 2018; KONÉ *et al.* 2010).

Os resultados desse estudo sugerem uma estratégia alternativa de controle de *Sclerotium rolfsii*, visto que o patógeno apresenta ampla distribuição geográfica e vasta diversidade de hospedeiros, por exemplo, amendoim, feijão, soja e tomate (TOMAZELI *et al.*, 2011; HENNING *et al.*, 2014; AMORIM *et al.*, 2016; AMORIM *et al.*, 2018; GASPAROTTO *et al.*, 2019), sendo responsável por perdas significativas em diferentes safras em todo mundo (FRANKE *et al.* 1998; PAPARU *et al.* 2018; KONÉ *et al.* 2010).

CONCLUSIONS

There is no *S. rolfsii* growth when using the concentration of 0.1% of *S. aromaticum* essential oil;

Concentrations of 0.0125; 0.025 and 0.05% of *S. aromaticum* oil also showed some levels of anti-fungal activity;

The essential oil from *S. aromaticum*, at a concentration of 0.1%, and the commercial fungicide Tiram[®], have similar results to control *S. rolfsii* in vitro.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES. We also thank to the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) whom supplied the isolate from the Prof. Maria Menezes plant pathogen's collection, used in the experiment.

CONCLUSÕES

Não há crescimento de *S. rolfsii* na concentração 0,1% do óleo essencial de *S. aromaticum*;

As concentrações (0,0125; 0,025 e 0,05%) do óleo *S. aromaticum* também apresentam alguma ação de atividade antifúngica;

O óleo essencial de *S. aromaticum*, na concentração 0,1%, e o fungicida Tiram[®] têm ação semelhante no controle de *S. rolfsii*, em condições in vitro.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES. Agradecemos também à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) por ceder o isolado utilizado no experimento proveniente da coleção de fitopatógenos Prof^a. Maria Menezes.

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016. 810 p.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. 561p.

BALLESTE, V. M.; MANTELLI, J. Presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos: um enfoque no pimentão e pepino. **Revista Geografia em Atos**, n. 17, v. 2, p. 44-63, 2020. DOI: <https://doi.org/10.35416/geoatos.v2i17.6480>.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>.

BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; WALCZAK, M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Current Microbiology**, v. 68, p. 71-81, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/S00284-013-0440-4>.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 240- 245, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000200018>.

- FRANKE, M.; BRENNEMAN, T. B.; STEVENSON, K. L.; PADGETT, G. Sensitivity of isolates of *Sclerotium rolfsii* from peanut in Georgia from selected fungicides. **Plant Disease**, v. 82, n. 5, p. 578-583, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.5.578>.
- GASPAROTTO, L.; REIS, A.; NAGATA, A. K. I.; NETTO, R. A. C.; SILVA, G. S. **Principais doenças do tomateiro no Amazonas**. MAPA, EMBRAPA, Circular Técnica 75, 2019.
- HENNING, A. A.; ALMEIDA, Á. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. MAPA, Embrapa Soja, Documentos 256, 5ª ed., 2014.
- KONÉ, D.; MOHAMED, D.; SORO, S.; BOLOUBI, B. A.; KOUADIO, Y. J. First report of Southern blight of Okra (*Abelmoschus esculentus*) caused by *Sclerotium rolfsii* in Côte d'Ivoire. **Plant Disease**, v. 94, n. 11, p. 1379, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0449>.
- KOTTEARACHCHI, N. S.; SAMMANI, A.; KELANIYANGODA, D. B. Anti-fungal activity of essential oils of Ceylon Eucalyptus species for the control of *Fusarium solani* and *Sclerotium rolfsii*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 45, n. 17, 2012.
- LIMA, T. S.; FRANÇA, K. R. S.; AZEVEDO, P. T. M.; PAIVA, Y. F.; SILVA, J. C. S.; SILVA, K. O.; SANTOS, A. B.; GALDINO, J. A. A. S.; JÚNIOR, A. F. M.; CARDOSO, T. A. L. Control of Some Phytopathogenic Fungi Using Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L.). **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 39, n. 3, p. 1-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.9734/jelai/2019/v39i330332>.
- MARIANI, C. M.; HENKES, J. A. Agricultura orgânica x Agricultura convencional, soluções para minimizar o uso de insumos industrializados. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v. 3, n. 2, p. 315-338, 2015. DOI: <https://doi.org/10.19177/rgsa.v3e22014315-338>.
- PAPARU, P.; ACUR, A.; KATO, F.; ACAM, C.; NAKIBUULE, J.; MUSOKE, S.; NKALUBO, S.; MUKANKUSI, C. Prevalence and incidence of four common bean root rots in Uganda. **Experimental Agriculture**, v. 54, p. 888-900, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0014479717000461>.
- PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICOLLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.
- PERINA, F. J.; AMARAL, D. C.; FERNANDES, R. S.; LABORY, C. R. G.; TEIXEIRA, G. A.; ALVES, E. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. **Pest Management Science**, v. 71, n. 10, p. 1371-1378, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3933>.
- R CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2018. Available: <https://www.R-project.org/>
- RAMOS, K.; JUNIOR, R. A.; ANDREANI, D. I. K. Óleos essenciais e vegetais no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 18, n. 2, p. 605-612, 2016. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084x/15_192.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>.
- ROJAS, D. F. C.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, p. 90-96, 2014. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X).
- SANTOS, L. G. M.; CARDOSO, M. G.; LIMA, R. K.; SOUZA, P. E.; GUIMARÃES, L. G. L.; ANDRADE, M. A. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (Cravo-da-índia). **TecnoLógica**, v. 11, n. 1, p. 11-14, 2007. DOI: <https://doi.org/10.17058/tecnolog.v11i1.154>.
- SHARMA, A.; RAJENDRAN, S.; SRIVASTAVA, A.; SHARMA, S.; KUNDU, B. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. XX, n. XX, p. 1-6, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>.

SHEAHAN, M.; BARRETT, C. B.; GOLDBALE, C. Human health and pesticide use in Sub-Saharan Africa. **Agricultural Economics**, v. 48, n. 51, p. 27-41, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/agec.12384>.

SILVA, E. K. C.; MELO, L. G. L. Manejo de doenças de plantas: Um enfoque agroecológico. **Revista EDUCAmazônia–Educação Sociedade e Meio Ambiente**. v. 10, n. 1, p. 143-157, 2013.

SILVA, J. S.; OLIVEIRA, R. C.; DINIZ, S. P. S. S. Óleo essencial de *Mentha arvensis* L. como agente no controle de fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. único, p. 99-100, 2012. DOI: <https://doi.org/10.12661/pap.2012.018>.

TAKESHITA, V.; OLIVEIRA, F. F.; WITT, F. A. P.; RIBEIRO, L. F. C. Efeito inibitório de extratos vegetais da Família *Allioideae* sobre *Guignardia citricarpa* - agente causal da mancha preta em *citrus*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 906-919, 2014.

TOMAZELI, V. N.; SANTOS, I.; MORALES, R. G. F. Resíduos orgânicos para o controle das doenças do feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. **Revista Ambiência**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5777/ambiencia.2011.01.04>.

XAVIER, A. L. S.; FRANÇA, K. R. S.; CARDOSO, T. A. L. Efeito do óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) sobre fungos fitopatogênicos em sementes de soja. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, e4529108660, 2020. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8660>

YAQUB, F.; SHAHZAD, S. Efficacy and persistence of microbial antagonists against *Sclerotium rolfsii* under field conditions. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 5, p. 2627-2634, 2011.