



LUNDOI TOBIAS LEE

**THE EFFICACY OF ESSENTIAL OILS AND *Bacillus* spp.
AGAINST *Lecanicillium fungicola*, THE CAUSAL AGENT OF
DRY BUBBLE DISEASE OF THE BUTTON MUSHROOM,
Agaricus bisporus.**

LAVRAS, MG

2021

LUNDOI TOBIAS LEE

**THE EFFICACY OF ESSENTIAL OILS AND *Bacillus* spp. AGAINST
Lecanicillium fungicola, THE CAUSAL AGENT OF DRY BUBBLE
DISEASE OF THE BUTTON MUSHROOM, *Agaricus bisporus*.**

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

Professor Dr. Eustáquio Souza Dias
Orientador

Professor Dr. Diego Cunha Zied
Co-orientador

Professor Dr. Eduardo Alves
Co-orientador

Professor Dr. John Andrew Pecchia
Co-orientador

Professor Dr. Ludwig Heinrich Pfenning
Co-orientador

LAVRAS, MG.

2021

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

Lee, Lundoï Tobias.

The efficacy of essential oils and *Bacillus* spp. against *Lecanicillium fungicola*, the causal agent of dry bubble disease of the button mushroom, *Agaricus bisporus* / Lundoï Tobias Lee. - 2020.

112 p. : il.

Orientador(a): Eustáquio Souza Dias.

Coorientador(a): Diego Cunha Zied, Eduardo Alves, John Andrew Pecchia.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.
Bibliografia.

1. óleos essenciais. 2. antagonismo. 3. doença da bolha seca. I. Dias, Eustáquio Souza. II. Zied, Diego Cunha. III. Alves, Eduardo. IV. Pecchia, John Andrew. V. Título.

LUNDOI TOBIAS LEE

A EFICÁCIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E *Bacillus* spp. CONTRA *Lecanicillium fungicola*, O AGENTE CAUSADOR DA DOENÇA DA BOLHA SECA NO COGUMELO CHAMPIGNON, *Agaricus bisporus*.

THE EFFICACY OF ESSENTIAL OILS AND *Bacillus* spp. AGAINST *Lecanicillium fungicola*, THE CAUSAL AGENT OF DRY BUBBLE DISEASE OF THE BUTTON MUSHROOM, *Agaricus bisporus*.

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

APROVADA em 18 de dezembro de 2020.

Dr. Diego Cunha Zied/UNESP

Dr. Jorge Teodoro de Souza/DFP/UFLA

Dr. John Andrew Pecchia/The Pennsylvania State University

Dra. Meire Cristina N. de Andrade/Faculdade Gran Tietê



Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade dessa existência, por encher meu coração de sonhos e me dar coragem para realiza-los e por todas as vezes que me senti amparada.

Agradeço ao meu orientador professor Eustáquio por toda paciência, por toda generosidade, por todos os conselhos e sempre me oferecer uma palavra amiga.

Agradeço a honra de no desenvolvimento desse trabalho a oportunidade de receber a orientação de grandes professores Roberta Hilsdorf Piccoli, Eduardo Alves, Ludwig Heinrich Pfenning, Diego Zied e John Andrew Pecchia.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de estudar em um dos Campus mais bonitos que já conheci, agradeço a oportunidade de conhecer pessoas e realidades muito diferentes da minha. Agradeço aos meus antigos amigos que a cada ano que passa nos aproximamos mais mesmo estando longe, agradeço aos meus novos amigos que me ajudaram nesses anos de doutorado.

Agradeço a minha família, agradeço especialmente a minha grande companheira de jornada minha gata Pitty por esses últimos nove anos e ao meu gatãozinho Espanador que virou estrelinha.

Agradeço aos meus companheiros do BIOFUNGI por toda ajuda, amizade e pelas infinitas risadas (sem dúvidas é uma das coisas que mais sentirei falta). Agradeço a Cidinha, Rose e ao Sr. Paulinho.

Agradeço especialmente ao Marcelo Reimer da empresa Cogumellus e ao Helton Cobucci da empresa Sítio dos Micélios, pela generosidade e pela grande contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"O conhecimento nos faz responsáveis." (Che Guevara)

RESUMO

O cogumelo champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) é um dos mais consumidos no mundo, fazendo parte da dieta regular da população em países da Europa, Ásia e parte da América do Norte. Além do seu valor gastronômico e nutricional, a produção de cogumelos é importante também por possibilitar a reciclagem de resíduos agrícolas e agroindustriais. Entretanto, como em qualquer outra atividade hortícola, o cultivo de cogumelos pode sofrer o ataque de pragas e doenças. Para o cultivo do champignon, uma das doenças mais importantes é a doença da bolha seca, causada pelo fungo *Lecanicillium fungicola*, o qual provoca de lesões necrosadas até deformidade total dos cogumelos e resulta em perdas significativas da produção. O controle de pragas no cultivo de cogumelos é feito através do uso de agrotóxicos, porém no Brasil não existe legislação vigente para essa prática e nem produto comercial registrado e seguro. Em função disso, tem-se buscado alternativas naturais, que não causem danos ambientais e à saúde. Neste contexto, os óleos essenciais (OE) são produtos naturais, extraídos de plantas aromáticas e com propriedades antimicrobianas conhecidas. Por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as propriedades antifúngicas dos OE de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eugenia caryophyllus* (cravo folha) e *Litsea cubeba* (pimenta chinesa) *in vitro* e *in vivo* para o controle de isolados de *L. fungicola*. var. *fungicola*, bem como o efeito sinérgico desses OE contra este fungo. O efeito dos OE na morfologia de *L. fungicola* foi estudado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os OE foram caracterizados pela presença de citronelal (35,57%), eugenol (88,90%) e geranial (42,25%) respectivamente. Todos os OE apresentaram 100% de inibição no crescimento micelial de *L. fungicola* nas concentrações de 1% e 0,1%. *L. cubeba* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) em concentrações mais baixas ($\geq 0,0156\%$). Com base nos resultados das concentrações fungicidas mínimas (CFM $\geq 0,0312\%$), o efeito inibitório dos OE foi mais eficiente em *L. cubeba*. Um efeito sinérgico foi observado a partir da combinação dos OE de *L. cubeba* com *C. winterianus* e *E. caryophyllus* com *L. cubeba* em uma concentração muito menor. A observação de MEV revelou aspecto de aspereza de hifas e esporos em amostras tratadas com OE. No teste *in vivo* os OE se mostraram eficientes no controle da incidência da doença da bolha seca sem prejudicar a produção de *A. bisporus*. Assim, o efeito antimicrobiano sinérgico e a eficácia observados neste estudo abrem novas perspectivas sobre o desenvolvimento de uma nova mistura antifúngica natural e potente contra *L. fungicola* na indústria de cogumelos. Para o teste de antagonismo, dois isolados de bactérias, *Bacillus* sp. (M17) e *Bacillus* sp. (M18), obtidos a partir de basidiomas de *A. bisporus*, foram avaliados por quatro diferentes métodos sobre quatro diferentes isolados de *L. fungicola*. Os resultados mostraram que as bactérias exercem atividade antagônica e inibem o crescimento do fungo. Além do preparo da suspensão de esporos, os surfactantes são utilizados na solubilização ou preparo de emulsões de óleos essenciais testados no controle de *L. fungicola*. Entretanto, como esses produtos também podem apresentar efeito inibitório, foi também avaliado o efeito de DMSO (dimetilsulfóxido), Tween 80 e Triton X-100, nas concentrações de 0,5 e 1%, sobre o crescimento micelial de *L. fungicola* e *A. bisporus*. Para DMSO, não se observou alterações visuais nas colônias para as duas espécies. Tween 80 afetou o crescimento micelial, fazendo com que as colônias crescessem menos, quando comparadas com o controle, além de alterar o aspecto da colônia para ambas as espécies. Triton X-100 apresentou efeito inibitório ainda maior sobre o crescimento das duas espécies fúngicas, afetando consideravelmente tanto o tamanho como a morfologia da colônia.

Palavras-chaves: *Agaricus bisporus*, *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus*, *Litsea cubeba*, antagonismo, CIM, CFM, MEV.

ABSTRACT

The white button mushroom (*Agaricus bisporus*) stands as one of the most consumed mushrooms in the world. In addition to being a food with nutritional value, mushroom production makes it possible to recycle agricultural and agro-industrial waste. The button mushroom cultivation can suffer injuries from insects, bacteria, viruses and fungi. However, the most relevant disease in this culture is the dry bubble disease caused by the fungus *Lecanicillium fungicola*, which causes necrotic lesions to total deformity of the mushrooms and results in significant losses of production. The control of pests in mushroom cultivation is done through the use of pesticides, however in Brazil there is no legislation in force for this practice or a registered and safe commercial product. Therefore, natural alternatives that do not cause environmental and health damage have been sought. Essential oils are natural products, extracted from aromatic plants and with known antimicrobial properties. Within this context, the aim of this work was to evaluate the antifungal properties of the essential oils of *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eugenia caryophyllus* (clove leaf) and *Litsea cubeba* (Chinese pepper) *in vitro* and *in vivo* for the control of *L. fungicola* strains. var. *fungicola*, as well as their synergistic effect. The effect of EO on the morphology of *L. fungicola* was studied by scanning electron microscopy (SEM). EO were characterized by the presence of citronellal (35.57%), eugenol (88.90%) and geraniol (42.25%), respectively. All EO showed 100% inhibition on the mycelial growth of *L. fungicola* at concentrations of 1% and 0.1%. *Litsea cubeba* showed minimum inhibitory concentration (MIC) at lower concentrations ($\geq 0.0156\%$). Based on the results of the minimum fungicidal concentrations (CFM $\geq 0.0312\%$), the inhibitory effect of *Litsea cubeba* EO was more efficient. A synergistic effect was observed from the combination of the *L. Cubeba* EO with *C. winterianus* and *E. caryophyllus* with *L. cubeba* at a much lower concentration. The SEM observation revealed an aspect of roughness of hyphae and spores in samples treated with EO. In the *in vivo* test, EO were efficient in controlling the incidence of dry bubble disease without impairing the production of *A. bisporus*. Thus, the synergistic antimicrobial effect and effectiveness observed in this study open new perspectives on the development of a new natural and potent antifungal mixture against *L. fungicola* in the mushroom industry. For the antagonism test, two strains of bacteria isolated from mushrooms, *Bacillus* sp. (M17) and *Bacillus* sp. (M18), were evaluated by four different methods on four different strains of *L. fungicola*. the results showed that the two bacterial strains exert antagonistic activity and inhibit the growth of the fungus. In addition to preparing the spore suspension, surfactants are used in the solubilization or preparation of essential oil emulsions tested in the control of *L. fungicola*. However, as these products may also have an inhibitory effect, DMSO (dimethylsulfoxide), Tween 80 and Triton X-100 were also evaluated at the concentrations of 0.5 and 1% on the mycelial growth of *L. fungicola* and *A. bisporus*. For DMSO, no visual changes were observed in the colonies for both species. Tween 80 affected mycelial growth, causing colonies to grow less when compared to control, in addition to changing the appearance of the colony for both species. Triton X-100 showed an even greater inhibitory effect on the growth of the two fungal species, considerably affecting both the size and the morphology of the colony. Scanning electron microscopy analyzes showed that surfactants alter the structures and aspects of the hyphae of both fungi and in the case of *L. fungicola* they also affect the quantity and aspect of the spores.

Keywords: *Agaricus bisporus*, *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus*, *Litsea cubeba*, antagonism, CIM, CFM, SEM.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	12
2.1 <i>Agaricus bisporus</i>	12
2.2 Doença da “bolha seca”.....	14
2.3 Atividade antifúngica de óleos essenciais	14
2.3.1 Citronela	16
2.3.2 Cravo	17
2.3.3 Pimenta chinesa	18
2.4 Efeitos sinérgicos de óleos essenciais.....	18
2.5 Atividade antagonista de bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	20
3. REFERÊNCIAS	21
SEGUNDA PARTE: Artigos	27
Artigo 1- Screening de óleos essenciais contra <i>Lecanicillium fungicola</i>	27
Artigo 2: Atividade antagonista de <i>Bacillus</i> spp. sobre <i>Lecanicillium fungicola</i> por diferentes métodos	47
Artigo 3: Efeito inibitório de DMSO, Tween 80 e Triton X-100 sobre <i>A. bisporus</i> e <i>Lecanicillium fungicola</i>	64
Artigo 4: Essential oils as an alternative to control <i>Lecanicillium fungicola</i> in the cultivation of champignon mushrooms	82

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de cogumelos é uma atividade que vem sendo exercida há anos nos países asiáticos, com destaque para a China, onde há relatos que tenha se iniciado por volta de 600 a.C com *Auricularia auricula*. Na Europa, o cultivo de *Agaricus bisporus* (cogumelo Paris ou champignon de Paris), foi iniciado na França durante o século XVII. Nas últimas décadas, a produção de cogumelos diversificou-se, além da ampliação da escala de cultivo em todo o mundo, contando atualmente com diversas espécies de cogumelos (KUES; LIU, 2000; MILES; CHANG, 2004).

Com o aumento da população mundial, os cogumelos são uma fonte alternativa de alimentos para suprir essa demanda, com qualidade nutricional e, para algumas espécies, com propriedades medicinais ou nutricêuticas. Os cogumelos cultiváveis são organismos decompositores, que participam da ciclagem de nutrientes no ambiente, possuindo, portanto, capacidade de bioconversão da biomassa lignocelulósica em alimentos de boa qualidade (MILES; CHANG, 2004).

Agaricus bisporus é umas das espécies de cogumelos comestíveis mais consumidas no mundo. Esta espécie tem grande relevância na cultura alimentar de milhões de pessoas ao redor do planeta, além de representar um notável exemplo de produção sustentável de alimentos, devido seu cultivo ser realizado em compostos produzidos a partir de resíduos agrícolas reciclados (KERTESZ; THAI, 2018).

Assim como outras atividades agrícolas, o cultivo de cogumelos pode sofrer injúrias devido à ação de pragas e doenças. No caso do champignon, uma das patologias mais importantes é conhecida como “doença da bolha seca” (*dry bubble*), sendo

responsável por grandes perdas na produção. O patógeno provoca lesões necrosadas no corpo de frutificação, causando deformidades e inviabilizando o consumo. O agente causal da doença é o fungo *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare e Gams, anteriormente classificado como *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk, (BERENDSEN *et al.* 2010; MILES; CHANG, 2004).

O controle desse agente patogênico ocorre através de boas práticas de higiene e uso de fungicidas. No Brasil, não há fungicidas registrados pelo Ministério da Agricultura para o controle de doenças no cultivo de cogumelos, ainda que os produtores os utilizem principalmente para o cultivo do champignon (ZIED *et al.* 2015). Devido ao fato do hospedeiro também ser sensível a fungicidas, o tratamento da doença da bolha seca se torna limitado a poucos produtos químicos, e tem-se notado o desenvolvimento de resistência desse fungo em relação aos fungicidas utilizados (BERENDSEN *et al.* 2010). Além da ocorrência de cepas do patógeno resistentes aos fungicidas, há uma preocupação acerca dos efeitos negativos dos pesticidas sobre a saúde. Em razão dessa realidade, tem-se buscado métodos alternativos de controle e, dentre eles, métodos naturais que não apresentem efeitos nocivos à saúde ou ao ambiente.

Óleos essenciais são compostos voláteis, naturais e complexos, extraídos de plantas aromáticas, como metabólitos secundários e apresentam odor forte. Os óleos essenciais apresentam características bactericida, antiviral, fungicida, além de outras propriedades medicinais (BAKKALI *et al.* 2008). Devido a todas essas propriedades, os óleos essenciais demonstram potencial de utilização como alternativa ao uso de pesticidas químicos.

Diferentes estudos apontaram a ação antifúngica de óleos essenciais no controle de diferentes espécies de fungos, inclusive aqueles que acometem o cultivo de *Agaricus bisporus*, tais como *Mycogone pernicioso* e *Lecanicillium fungicola* (SOKOVIĆ *et al.* 2009; REGNIER; COMBRINCK, 2010; SANTOS *et al.* 2017; LEE *et al.* 2020). Esses trabalhos demonstraram o potencial de utilização dos óleos essenciais no controle de doenças para o cultivo de cogumelos, entretanto, faltam ainda estudos “*in vivo*” e a sua avaliação em estruturas de cultivo comercial. A aplicabilidade efetiva dessas substâncias depende também de estudos de viabilidade, tanto no aspecto de custo como de executabilidade, antes de ser considerada uma alternativa promissora aos fungicidas sintéticos.

Outra alternativa para controlar doenças no cultivo de cogumelos é a utilização de antagonistas naturais, cuja prática possibilita a produção de alimentos mais saudáveis, minimiza problemas de saúde e ambientais, causados normalmente pelo uso de agrotóxicos. Inúmeros produtos feitos a partir de bactérias do gênero *Bacillus* estão disponíveis como pesticidas biológicos, e esses produtos já foram aplicados em diferentes setores da agricultura convencional (PÉREZ-GARCÍA *et al.* 2011).

Dentro desse contexto, esse estudo teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico de diferentes tipos de óleos essenciais e cepas de *Bacillus* spp. para o controle de *Lecanicillium fungicola*, agente causal da doença da bolha seca em *Agaricus bisporus*.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 *Agaricus bisporus*

Este cogumelo foi classificado inicialmente como *Psalliota hortensis* Lange, sendo posteriormente renomeado para *Agaricus brunnescens* Peck ou *Agaricus bisporus* Lange Sing. A classificação de Peck é anterior à de Lange e, por isso, segundo as regras taxonômicas, *A. brunnescens* seria a classificação correta. Entretanto, *A. bisporus* tem sido o nome utilizado preferencialmente (HAYES, 1978; CHALLEN; ELLIOTT, 1985).

A China detém cerca de 54% da produção mundial de *A. bisporus*, e a estimativa de produção do ano de 2013 foi em torno de 2,37 bilhões de kg. Em segundo lugar vem o Estados Unidos, com produção em torno de 9% (cerca de 409 milhões de kg), seguido pela Polônia (285 milhões de kg), Holanda (270 milhões de kg) e a Índia (250 milhões de kg) (ROYSE *et al.* 2017). O Brasil sequer aparece nas estatísticas mundiais, uma vez que o volume de produção ainda é muito baixo. Entretanto, a produção vem crescendo ano após ano, constituindo-se em uma importante atividade para pequenas e médias empresas, além dos pequenos produtores rurais (DIAS, 2010).

Quando o fungo coloniza um substrato, para que ocorra o surgimento de cogumelos, esse fungo precisa ser submetido a um fator de indução para desenvolver a frutificação. No caso do champignon, a redução da temperatura é um dos principais fatores que induz a frutificação. Na natureza, nos países de clima temperado, os cogumelos frutificam normalmente no quando a temperatura começa a declinar antes do

início do inverno, ou na primavera, depois de um longo período de temperaturas mais baixas durante o inverno. Para os cultivos comerciais, em condições controladas, a temperatura de indução da frutificação do champignon foi estabelecida entre 17 e 19°C (DIAS; ABE; SCHWAN, 2004).

Muitos cogumelos são saprófitos primários, capazes de degradar componentes lignocelulósicos complexos. O *Agaricus bisporus* é um decompositor secundário, atuando sobre substratos que já passaram por uma etapa inicial de decomposição. Por isso, para o seu cultivo é necessário utilizar um substrato que passou por um processo de compostagem. Tradicionalmente, utiliza-se um substrato à base de palha de trigo misturada com esterco de aves e gesso. O processo de compostagem é dividido em duas etapas, denominadas Fase I e Fase II. A Fase I consiste de um período de pré-fermentação (6 dias), durante o qual a palhada é umedecida até que as fibras estejam amolecidas, seguido da montagem e reviragem da meda de compostagem a cada dois dias. Os suplementos são adicionados nesta segunda etapa, que dura de 6 a 8 dias. A Fase II é também subdividida em duas etapas. Na primeira, ocorre a pasteurização com o objetivo de eliminar insetos, pragas e esporos de outros microrganismos contaminantes do substrato. Esta etapa é conduzida a 57-59° C e dura de 6 a 8h. Na segunda etapa, realiza-se o condicionamento do composto, o qual implica na eliminação de amônia do composto, a qual é convertida em proteína microbiana. Esta etapa é conduzida em temperatura de 45 a 53° C e dura de 6 a 8 dias, dependendo do tempo necessário para atingir a temperatura ideal para cada etapa (BUTH, 2017; DHAR, 2017; GÓMEZ, 2017). Ao final do processo, depois que a temperatura do composto atinge a temperatura ambiente, é realizada a inoculação e condução da colonização do mesmo, sendo esta considerada a Fase III do processo. Após a completa colonização, é feita a cobertura do composto colonizado e, por fim, quando a mesma encontra-se completamente colonizada inicia-se a etapa final do processo, que consiste na indução da frutificação, com a redução da temperatura para 17-19° C e redução do teor de CO₂ para 1000 ppm (MILES; CHANG, 2004).

A produção de cogumelos pode ser intensamente afetada por patógenos de origem fúngica, bacteriana e viral, os quais são capazes de afetar o rendimento e a qualidade. Os principais fungos que acometem o *A. bisporus* são *Mycogone pernicioso*, *Lecanicillium fungicola*, *Trichoderma aggressivum* e *Cladobotryum* sp., causando as doenças da bolha úmida, bolha seca, mofo verde e teia de aranha, respectivamente (POTOCNIK *et al.* 2015).

2.2 Doença da “bolha seca”

O patógeno *L. fungicola* tem importância para a indústria de cogumelos, pois provoca perdas em torno de 2-4 % da produção, sendo considerada umas das principais doenças que afeta *A. bisporus* (BERENDSEN *et al.* 2010). Essas perdas podem ser muito maiores quando se considera a queda de qualidade do produto, em função das lesões necróticas formadas sobre o píleo do cogumelo.

O agente causal da bolha seca (*dry bubble*) em *A. bisporus* foi identificado a princípio como *Verticillium fungicola* (BERNARDO *et al.* 2004). Posteriormente, Zare e Gams (2008), reclassificaram a espécie como *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare e Gams [sinônimo: *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk, *Verticillium malthousei* (Preuss) Ware] (BERENDSEN *et al.* 2010).

A camada de cobertura, em especial, a turfa, é a principal fonte de inóculo de *L. fungicola*. Uma vez presentes no ambiente, os conídios são facilmente disseminados pelo ar, e os sistemas de ventilação podem auxiliar a espalhar a contaminação nos locais de cultivo. Os sintomas associados a doença da bolha seca, são divididos em dois grupos: infecções que acometem os cogumelos nos estágios iniciais e infecções que ocorrem em estágios mais avançados de crescimento. Conseqüentemente, os sintomas são de aspectos variados e sofrem influência pelo estágio de desenvolvimento dos corpos de frutificação no momento que a infecção ocorre (GEA; NAVARRO, 2017).

Se a infecção ocorrer nos estágios iniciais de desenvolvimento dos corpos de frutificação, os mesmos desenvolvem-se como pequenas massas esféricas de tecido, sem a diferenciação entre estipe, lamela e píleo. No início, essas massas são brancas como os cogumelos e vão adquirindo tons acinzentados, indicando o início da esporulação do patógeno. Se a infecção ocorre em estágios de desenvolvimentos mais avançados, os píleos são formados com deformidades, surgem lesões com aspecto ressecado e tem textura semelhante a couro (GEA; NAVARRO, 2017).

2.3 Atividade antifúngica de óleos essenciais

Óleos essenciais são metabólitos secundários das plantas aromáticas, caracterizados como compostos voláteis, naturais, e de odor forte. Na natureza, os óleos

essenciais desempenham a função de proteger as plantas contra bactérias, fungos, vírus e insetos. Podem também atrair alguns insetos benéficos, que favorecem a dispersão de sementes ou pólen ou ainda repelir os insetos que são prejudiciais. As mesmas funções que os óleos essenciais desempenham na natureza conferem a eles características úteis para o homem. São conhecidas suas propriedades antissépticas, bactericida, fungicida e antiviral, podendo ser utilizados como antimicrobianos e para preservar alimentos. Também podem ser utilizados como sedativos, analgésicos, anti-inflamatórios e anestésicos locais (BAKKALI *et al.* 2008).

Durante séculos, as propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais oriundos de plantas tem sido reconhecida empiricamente, porém, apenas há pouco tempo foram comprovadas cientificamente, em estudos publicados a partir da década de 1970. Muitos estudos analisaram a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo, baseados no conhecimento tradicional de espécies nativas, demonstrando a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários (JANSSEN; SCHEFFER; SVENDSEN, 1987).

A composição química dos óleos essenciais varia de acordo com as condições climáticas, condições geográficas, estações do ano, período de colheita e da técnica de extração (MACIEL *et al.* 2002). Os principais elementos que constituem esses óleos são os monoterpenos, sesquiterpenos e os compostos aromáticos de baixo peso molecular (LANGENHEIM, 1994). As diferenças entre os constituintes e a composição dos óleos essenciais influenciam diretamente na atividade antimicrobiana (BAKKALI *et al.* 2008).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais ocorre devido a capacidade dos constituintes de penetrarem na parede celular de fungos ou bactérias e devido à solubilidade na bicamada lipídica da membrana celular (KNOBLOCH *et al.* 1989). Os constituintes dos óleos essenciais agem diretamente na estrutura da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade, provocando desordem, alterando o transporte de íons e inibindo a respiração celular. Esses danos na estrutura da membrana promovem o comprometimento das funções, como local de ação de enzimas, barreira seletiva e geração de energia (BAKKALI *et al.* 2008).

Outro mecanismo de ação que os óleos essenciais proporcionam é a inibição do crescimento micelial e a interferência na produção e germinação de conídios, que varia

de acordo com a composição e concentração do óleo utilizado. A infecção inicial se desenvolve a partir da germinação dos conídios, por isso, inibir essa fase é fundamental para que a doença não se desenvolva. Essa ação é considerada bem sucedida quando o óleo essencial é capaz de inibir o crescimento micelial e a germinação de conídios (AQUINO *et al.* 2014).

2.3.1 Citronela

O gênero *Cymbopogon* é membro da família Poaceae que são ervas conhecidas em todo mundo devido ao alto teor de óleos essenciais. A planta *Cymbopogon winterianus* é uma erva aromática de cerca de 1 metro de altura, conhecida popularmente como citronela ou capim-citronela, apresenta folhas longas, que quando maceradas liberam odor forte semelhante ao eucalipto-limão (*Eucalyptus citriodora*), (LORENZI, 2008). São distribuídas de forma ampla em todos os continentes onde são utilizados de diversas maneiras. Os usos comerciais e medicinais de espécies do gênero *Cymbopogon* estão bem relatados. Evidências etnofarmacológicas demonstram que apresentam variadas propriedades que justificam o uso no controle de pragas, na produção de cosméticos e como agentes anti-inflamatórios, antitumorais e quimio preventivos (AVOSEH *et al.* 2015). A citronela é encontrada em áreas de clima tropical e subtropical, em regiões da Ásia, África e América (WANY *et al.* 2013), sendo cultivada também no Brasil (DE OLIVEIRA *et al.* 2011). *C. winterianus* apresenta propriedade larvicida contra *Aedes aegypti* (MENDONÇA *et al.* 2005), antibacteriana (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ *et al.* 2019), antifúngica (LOZADA *et al.* 2019) e inseticida (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.* 2019), além de ser utilizada como repelente de insetos (CHOO LUCK *et al.* 2019). Posteriormente, observou-se também que a planta apresenta um efeito depressor no sistema nervoso central e anticonvulsivante (BAHR *et al.* 2019).

O óleo de citronela, extraído do capim-citronela é bastante utilizado na indústria de cosméticos, perfumaria e de aromas em todo o mundo. Este óleo é classificado comercialmente em dois tipos: Citronela-do-Ceilão obtido a partir de *C. nardus*, sendo considerado um tipo inferior, enquanto o óleo de citronela do tipo Java obtido de *C. winterianus* Jowitt, é classificado como do tipo superior (WANY *et al.* 2013). Como esta espécie foi introduzida na Indonésia, o seu óleo tornou-se conhecido comercialmente

como citronela de Java. Posteriormente, a variedade Javanesa foi introduzida também na Índia em 1959 (SHASANY *et al.* 2000).

Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. winterianus* são citronelal, geraniol e citronelol (QUINTANS-JÚNIOR *et al.* 2011). O componente citronelal é responsável pela ação repelente e inseticida contra diversos insetos e larvas (LORENZI, 2008).

2.3.2 Cravo

O craveiro (*Syzygium aromaticum*) é uma dicotiledônea pertencente à família Myrtaceae, cuja espécie é conhecida também por vários sinônimos, entre eles: *Caryophyllus aromaticus*, *Caryophyllus silvestris*, *Eugenia caryophyllus*, *Jambosa caryophyllus* e *Myrtus caryophyllus* (SOH; PARNELL, 2015). O cravo é considerado uma especiaria de grande valor, ocupando a posição da segunda mais importante no comércio mundial. É originário da Índia e cultivado em vários países tropicais, inclusive no Brasil, onde o seu cultivo ocorre no sul da Bahia. A especiaria recebe diversos nomes populares entre eles: cravinho, cravinho-da-Índia, cravo-da-Índia, cravo, cravo-aromático, cravo-de-doce, etc (LORENZI, 2008).

Várias propriedades medicinais são atribuídas ao cravo, sendo o seu uso sistêmico ou tópico preconizado na medicina tradicional (SINGH *et al.* 2009). O cravo apresenta atividade anticonvulsivante (BAHR *et al.* 2019), antiviral (TRAGOOLPUA; JATISATIENR, 2007), antioxidante (HEMALATHA *et al.* 2016), antipirética (FENG; LIPTON, 1987), antibacteriana (EL AMRANI *et al.* 2019) e antifúngica (PINTO *et al.* 2019), podendo ser usado ainda como anestésico local (GHELARDINI *et al.* 2001).

Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial de cravo são eugenol e acetato de eugenil (HEMALATHA *et al.* 2016). Além do cravo, pode-se extrair também o óleo essencial das folhas do craveiro, o qual apresenta odor característico e agradável, com coloração amarelo claro. O óleo das folhas apresenta como componentes majoritários eugenol, β -cariofileno, acetato de eugenol e α -humuleno (KAUR; KAUSHAL, 2019).

2.3.3 Pimenta chinesa

Litsea cubeba (Lour.) Pers. é uma árvore aromática de porte pequeno, pertencente à família Lauraceae, distribuída pelo continente asiático, sendo encontrada na China, Nepal, nordeste da Índia e vários países do Sudeste Asiático (Indonésia, Laos, Mianmar, Tailândia e Vietnã). *L. cubeba* é popularmente conhecida como May Chang ou pimenta chinesa, sendo utilizada há milhares de anos na medicina chinesa para tratar inúmeras doenças (CHEN *et al.* 2013). É considerada planta aromática, sendo que quase todas as partes da planta produzem óleo rico em citral (SAIKIA *et al.* 2013). A maior parte do óleo é encontrada na casca, e quantidades menores são encontradas nas folhas e no caule (CHEN *et al.* 2013), tendo como composto majoritário o citral (GAO *et al.* 2019).

As propriedades medicinais de *L. cubeba* são amplamente documentadas, há relatos de que auxiliam no tratamento de distúrbios gastro-intestinais (KAMLE *et al.* 2019) e de eczema (ANDERSON *et al.* 2000). Possui também propriedades anti-inflamatórias (CHOI; HWANG, 2004), citotóxica para células tumorais (HO *et al.* 2010), ação antioxidante (SHE *et al.* 2019), antifúngica (NARDONI *et al.* 2019) e antibacteriana (NGUYEN *et al.* 2019). Além da sua utilização para fins terapêuticos, *L. cubeba* pode ser utilizada na indústria de cosméticos (HUANG *et al.* 2013), como fonte alternativa de energia renovável com a produção de biodiesel (CHEN *et al.* 2013), inseticida (JIANG *et al.* 2009; EL-SHEWY *et al.* 2019) e como repelente (YANG *et al.* 2014).

2.4 Efeitos sinérgicos de óleos essenciais

Em relação às propriedades biológicas, os óleos essenciais são misturas complexas de diferentes e variadas moléculas, o que levanta o questionamento se os efeitos biológicos ocorrem em consequência da ação de uma molécula presente em níveis mais elevados ou como resultado de um sinergismo de todas as moléculas (BAKKALI *et al.* 2008). A combinação de substâncias mostra a interação efetiva dos principais constituintes, demonstrando efeitos sinérgicos com a capacidade de inibir ou inativar patógenos. Essas combinações resultam em uma redução considerável da intensidade e custos dos tratamentos (BERDEJO *et al.* 2019).

No sinergismo ocorre a interação de dois ou mais medicamentos, que, como resultado, apresenta melhor efeito do que cada um deles isolados, o que pode desencadear o aumento da eficácia, diminuição da toxicidade, redução dos efeitos adversos, menor dose utilizada e afetar a resistência bacteriana aos antimicrobianos (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011). Em relação a interação de substâncias, também pode ocorrer a indiferença farmacológica, onde a associação de dois ou mais medicamentos não interfere no mecanismo de ação um do outro e não ocorre a interação em nenhum momento na farmacodinâmica ou farmacocinética. O antagonismo é quando a ação farmacológica de um medicamento é reduzida ou suprimida na presença de outro através de mecanismos químicos, farmacocinéticos, competição ou bloqueio de um mesmo receptor (LORIAN, 2005).

Um dos métodos para avaliar *in vitro* o efeito sinérgico das substâncias é o teste de *checkerboard*, pois indica a atividade inibitória, através de uma técnica de microdiluição modificada (LI *et al.*, 1993). Esta técnica é baseada em um tabuleiro de xadrez, e se refere ao padrão de diluição de uma substância. As substâncias a serem testadas são distribuídas na placa de microtitulação. Na vertical, cada poço contém uma concentração diferente diluída da substância a ser testada de forma decrescente. Na horizontal, uma segunda substância é adicionada a cada poço da microplaca, da esquerda para a direita de forma crescente. Desse modo, cada poço apresenta concentrações diferentes de cada uma das substâncias testadas em um mesmo volume final. Esse método é vantajoso, pois é possível testar várias combinações de diferentes concentrações de substâncias distintas de uma mesma amostra (LORIAN, 2005).

O método de *Checkerboard* é utilizado para quantificar o efeito de combinações de agentes antimicrobianos no crescimento de microrganismos. Essas combinações podem proporcionar melhores resultados no combate a esses patógenos, além de ampliar o espectro de ação, bem como a prevenção de resistência dos microrganismos. A utilização dessa técnica possibilita encontrar as concentrações mais eficazes de óleos essenciais combinados ou não para controlar o microrganismo em estudo.

2.5 Atividade antagonista de bactérias do gênero *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* são aeróbicas, esporulantes e em forma de bastonetes, sendo encontradas em todos os lugares da natureza. Algumas espécies são patogênicas para humanos e animais, mas a grande maioria é saprófita e não prejudicial. As espécies de *Bacillus* apresentam a capacidade de produzir uma série de enzimas, antibióticos e outros metabólitos e por esses fatores essas bactérias são amplamente utilizadas nas áreas médicas, farmacêuticas, industriais e agrícolas (TURNBULL; KRAMER; MELLING, 1991). Este grande potencial é oriundo de uma variedade de compostos antagônicos de diferentes estruturas. Estima-se que, cerca de 5 a 8% do genoma total dessas bactérias são destinados a produzir metabólitos secundários. Cepas de *Bacillus* apresentam capacidade de biocontrole através da atividade inibitória sobre o crescimento de fitopatógenos, além de induzir resistência sistêmica em plantas e competir por nichos ecológicos com fitopatógenos (FIRA *et al.* 2018).

Microrganismos fitopatogênicos são ameaças importantes e permanentes à produção sustentável de alimentos. O modo de controle desses microrganismos e de outras pragas é com o uso de agrotóxicos, porém o uso recorrente dessas substâncias resulta em vários problemas ambientais e à saúde humana. Uma alternativa sustentável aos agrotóxicos é o controle biológico usando antagonistas benéficos. Um dos microrganismos promissores para a agricultura sustentável é o *Bacillus subtilis*, que foi relatado como um promotor de crescimento e como antagônico a uma variedade de patógenos *in vitro* e em casa de vegetação e estudos de campo (WANG *et al.* 2018).

Além dos vários estudos sobre o uso de *Bacillus* na agricultura, Stanojević *et al.* (2019) e Milijašević-Marčić *et al.* (2016) relataram a utilização de cepas de *Bacillus* sp. e *Bacillus subtilis* oriunda do substrato de cultivo de *A. bisporus*, contra doenças fúngicas que acometem esse cogumelo, dentre elas a doença da bolha seca. Portanto, esses estudos apontam para um novo campo de pesquisa na utilização dessas bactérias no controle biológico de pragas e doenças no cultivo de cogumelos comestíveis.

3. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, C.; LIS-BALCHIN, M.; KIRK-SMITH, M. Evaluation of massage with essential oils on childhood atopic eczema. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 14, n. 6, p. 452-456, 2000.
- AQUINO, C. F. et al. Composição química e atividade in vitro de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 329-336, 2014.
- AVOSEH, Opeyemi et al. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7438-7453, 2015.
- BAHR, Tyler A. et al. The effects of various essential oils on epilepsy and acute seizure: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
- BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BERENDSEN, Roeland L. et al. *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. **Molecular plant pathology**, v. 11, n. 5, p. 585-595, 2010.
- BERNARDO, Dolores et al. *Verticillium* disease or "dry bubble" of cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan. **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 9, p. 729-735, 2004.
- BUTH, Jos. Compost as a Food Base for *Agaricus bisporus*. **Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**, p. 129-147, 2017.
- CHALLEN, M. P.; ELLIOTT, T. J. The in vitro responses to a range of fungicides of two strains of the mushroom *Agaricus bisporus* and the pathogen *Verticillium fungicola*. **Mycopathologia**, v. 90, n. 3, p. 161-164, 1985.
- CHEN, Yicun et al. Biology and chemistry of *Litsea cubeba*, a promising industrial tree in China. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 2, p. 103-111, 2013.
- CHOI, Eun-Mi; HWANG, Jae-Kwan. Effects of methanolic extract and fractions from *Litsea cubeba* bark on the production of inflammatory mediators in RAW264. 7 cells. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 141-148, 2004.
- CHOOLOCK, Kotchaphan et al. Repellency Effects of Essential Oils of *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus globulus*, *Citrus hystrix* and their major Constituents against Adult German Cockroach (*Blattella germanica* Linnaeus (*Blattaria: Blattellidae*)). **Jordan Journal of Biological Sciences Short Communication**, v. 12, n. 4, 2019.

- DE MENDONÇA, Fernando AC et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 629-636, 2005.
- DHAR, Behari Lal. Mushroom Farm Design and Technology of Cultivation. **Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**, p. 271-308, 2017.
- DIAS, Eustáquio Souza. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 795-803, 2010.
- DIAS, Eustáquio Souza; ABE, Carlos; SCHWAN, Rosane Freitas. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 5, p. 545-549, 2004.
- ELGIZAWY, K. K. H.; EL-SHEWY, A. M.; MORSY, Amany R. Evaluation of Essential Oil and its Main Active Ingredients of Chinese *Litsea cubeba* Against Two Stored-Grain Insects. **Academic Journal of Entomology**, v. 12, n. 2, p. 29-39, 2019.
- FENG, Jiadi; LIPTON, J. M. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 12, p. 1775-1778, 1987.
- FIRA, Djordje et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.
- GAO, Ming et al. Changes in the Profiles of Yield, Yield Component, Oil Content, and Citral Content in *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon Following Foliar Fertilization with Zinc and Boron. **Forests**, v. 10, n. 1, p. 59, 2019.
- GEA, Francisco J.; NAVARRO, María J. Mushroom diseases and control. **Edible and medicinal mushrooms: technology and applications**, p. 239-259, 2017.
- GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Il Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 387-389, 2001.
- GÓMEZ, Arcadio. New Technology in *Agaricus bisporus* Cultivation. **Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**, p. 211-220, 2017.
- HAYES, W. A. Biological nature. In: **The biology and cultivation of edible mushrooms**. Academic Press, 1978. p. 191-217.
- HEMALATHA, R. et al. Phytochemical composition, GC-MS analysis, in vitro antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 2, p. 1189-1198, 2016.
- HO, Chen-Lung et al. Compositions and *in vitro* anticancer activities of the leaf and fruit oils of *Litsea cubeba* from Taiwan. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 4, p. 1934578X1000500425, 2010.
- HUANG, Xiao-Wei et al. Potential cosmetic application of essential oil extracted from *Litsea cubeba* fruits from China. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 2, p. 112-119, 2013.

- JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; SVENDSEN, A. Baerheim. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. **Planta medica**, v. 53, n. 05, p. 395-398, 1987.
- JIANG, Zhili et al. Comparative toxicity of essential oils of *Litsea pungens* and *Litsea cubeba* and blends of their major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4833-4837, 2009.
- KAMLE, Madhu et al. Ethnopharmacological properties and medicinal uses of *Litsea cubeba*. **Plants**, v. 8, n. 6, p. 150, 2019.
- KAUR, K.; KAUSHAL, S. Phytochemistry and pharmacological aspects of *Syzygium aromaticum*: A review. **J. Pharmacogn. Phytochem**, v. 8, p. 398-406, 2019.
- KERTESZ, Michael A.; THAI, Meghann. Compost bacteria and fungi that influence growth and development of *Agaricus bisporus* and other commercial mushrooms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1639-1650, 2018.
- KNOBLOCH, Karl et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, n. 3, p. 119-128, 1989.
- KÜES, U.; LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 141-152, 2000.
- LALAMI, A. El Ouali et al. Evaluation of antibacterial and antioxidant effects of cinnamon and clove essential oils from Madagascar. **Materials Today: Proceedings**, v. 13, p. 762-770, 2019.
- LANGENHEIM, Jean H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of chemical ecology**, v. 20, n. 6, p. 1223-1280, 1994.
- LEE, Lundo Tobias et al. Screening de óleos essenciais contra *Lecanicillium fungicola*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e269997098-e269997098, 2020.
- LI, R. C.; SCHENTAG, J. J.; NIX, D. E. The fractional maximal effect method: a new way to characterize the effect of antibiotic combinations and other nonlinear pharmacodynamic interactions. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 3, p. 523-531, 1993.
- LORENZI, H. .. MATOS. F. J. .. 2.a Edição Revisada. [S. l.], p. 544, 2008.
- LORIAN, Victor (Ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- LOZADA, Maria Isabel Ordonez et al. Essential oils in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* f. Sp. cepae in onion seeds. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 50, n. 3, p. 510-518, 2019.
- MACIEL, Maria Aparecida M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

- MILES, Philip G.; CHANG, Shu-Ting. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. CRC press, 2004.
- NARDONI, Simona et al. In vitro activity of essential oils against *Saprolegnia parasitica*. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1270, 2019.
- NGUYEN, Quang Huy et al. Characterization of endophytic *Streptomyces griseorubens* MPT42 and assessment of antimicrobial synergistic interactions of its extract and essential oil from host plant *Litsea cubeba*. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 197, 2019.
- OLIVEIRA, Wyly Araújo de et al. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 433-441, 2011.
- PÉREZ-GARCÍA, Alejandro; ROMERO, Diego; DE VICENTE, Antonio. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187-193, 2011.
- PINTO, Sandra Milena Leal et al. Semisynthetic eugenol derivatives as antifungal agents against dermatophytes of the genus *Trichophyton*. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 7, p. 1109-1117, 2019.
- POTOČNIK, Ivana et al. Chemical and biological control of cultivated mushroom diseases. In: **Proceedings of the 7th Congress on Plant Protection" Integrated Plant Protection-a Knowledge-Based Step Towards Sustainable Agriculture, Forestry and Landscape Architecture"**. November 24-28, 2014, Zlatibor, Serbia. Plant Protection Society of Serbia (PPSS), 2015. p. 59-63.
- QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo et al. Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 6, p. 630-639, 2011.
- REGNIER, T.; COMBRINCK, S. *In vitro* and in vivo screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 681-685, 2010.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, Álvaro et al. Insecticidal Properties of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon winterianus* against *Acanthoscelides obtectus*, Insect Pest of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Insects**, v. 10, n. 5, p. 151, 2019.
- ROYSE, Daniel J.; BAARS, Johan; TAN, Qi. Current overview of mushroom production in the world. **Edible and medicinal mushrooms: technology and applications**, p. 5-13, 2017.
- SAIKIA, Anil Kumar et al. Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. from north-east India—chemical composition and antimicrobial activity. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 4, p. 330-338, 2013.
- SANTOS, Tamara Leite dos et al. Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. **Ciência Rural**, v. 47, n. 5, 2017.

- SHASANY, A. K. et al. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, n. 5, p. 553-559, 2000.
- SHE, Qi-Hui et al. Chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant activity of *Litsea cubeba* essential oils in different months. **Natural product research**, v. 34, n. 22, p. 3285-3288, 2020.
- SINGH, Anand Kumar; DHAMANIGI, Sunil S.; ASAD, Mohammed. Anti-stress activity of hydro-alcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove). **Indian journal of pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 28, 2009.
- SOH, Wu-Kuang; PARNELL, John. A revision of *Syzygium Gaertn.* (Myrtaceae) in Indochina (Cambodia, Laos and Vietnam). **Adansonia**, v. 37, n. 2, p. 179-275, 2015.
- SOKOVIĆ, Marina D. et al. Chemical composition of essential oils of thymus and mentha species and their antifungal activities. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 238-249, 2009.
- THIELMANN, J.; MURANYI, P. Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 5, p. 361-378, 2019.
- TRAGOOLPUA, Y.; JATISATIENR, A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & SG Harrison and essential oil, eugenol. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 12, p. 1153-1158, 2007.
- TURNBULL, Peter CB; KRAMER, J. M.; MELLING, J. *Bacillus*. **Manual of clinical microbiology**, v. 5, p. 296-303, 1991.
- VAN VUUREN, Sandy; VILJOEN, Alvaro. Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta medica**, v. 77, n. 11, p. 1168-1182, 2011.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, Daniel et al. Anti-biofilm efficacy of single and binary treatments based on plant essential oils against *Escherichia coli* persistent in food-processing facilities. **Food science and technology international**, v. 25, n. 5, p. 385-393, 2019.
- WANG, X. Q. et al. Application and mechanisms of *Bacillus subtilis* in biological control of plant disease. In: **Role of rhizospheric microbes in soil**. Springer, Singapore, 2018. p. 225-250.
- WANY, Aakanksha et al. Chemical analysis and therapeutic uses of citronella oil from *Cymbopogon winterianus*: A short review. **International Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 6, p. 504-521, 2013.
- YANG, Kai et al. Bioactivity of essential oil of *Litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 459-466, 2014.

ZARE, Rasoul; GAMS, Walter. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. **Mycological research**, v. 112, n. 7, p. 811-824, 2008.

SEGUNDA PARTE: Artigos

Artigo 1- Screening de óleos essenciais contra *Lecanicillium fungicola*

Artigo Publicado no periódico: **Research, Society and Development**

DOI:<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7098>

Resumo

O fungo *Lecanicillium fungicola* é o agente causador da doença da bolha seca em cogumelos do tipo champignon (*Agaricus bisporus*), sendo responsável por perdas econômicas. Esse patógeno causa manchas e deformidades nos cogumelos, tornando-os inviáveis para comercialização. O seu controle pode ser feito com o uso de fungicidas, além das medidas sanitizantes. Entretanto, no Brasil não existe legislação vigente para a utilização de agrotóxicos em cultivos de cogumelos, o que impede a sua utilização de forma legal. Devido a isso, e à necessidade de evitar o uso de pesticidas, tem se buscado alternativas naturais para o controle de pragas e doenças. Os óleos essenciais têm ação antimicrobiana comprovada em diversos estudos e, por isso, podem ser uma boa alternativa para o controle de *L. fungicola* no Brasil. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antifúngica de diferentes óleos essenciais ou compostos majoritários sobre o crescimento micelial de *L. fungicola*. Para isto, 13 óleos essenciais e nove compostos majoritários foram testados *in vitro* quanto ao seu efeito sobre o crescimento micelial do fungo, utilizando o método de difusão em meio, nas concentrações de 1 e 0,1%. Alguns óleos ou compostos majoritários apresentaram apenas uma inibição parcial, a qual variou de 62 a 97%, dependendo da concentração utilizada (0,1 ou 1%). Entretanto, a maioria deles apresentou 100% de inibição do crescimento fúngico nas duas doses testadas. Portanto, os testes *in vitro* demonstraram um grande potencial desses compostos como agentes de controle de *L. fungicola* no cultivo de *A. bisporus*.

Palavras-chave: Doença da bolha seca; *Agaricus bisporus*; cogumelos; atividade antifúngica.

Abstract

The fungus *Lecanicillium fungicola* is the causative agent of dry bubble disease in white button mushroom (*Agaricus bisporus*), being responsible for economic losses. This pathogen causes spots and deformities in the mushrooms, making them unmarketable. Its control can be done with the use of fungicides, in addition to hygiene measures. However, in Brazil there is no approved pesticides for mushroom cultivation, which prevents its legal use. Because of this, and the need to avoid the use of pesticides, natural alternatives have been sought for the control of pests and diseases. Essential oils have proven antimicrobial action in several studies and, therefore, can be a good alternative for the control of *L. fungicola* in Brazil. Thus, the objective of this work was to evaluate the antifungal action of different essential oils and major compounds on the mycelial growth of *L. fungicola*. Therefore, 13 essential oils and nine major compounds were tested *in vitro* in order to evaluate the mycelial growth of the fungus. The medium diffusion method was used at 1 and 0,1% concentrations. Some oils and major components showed only partial inhibition, which varied from 62 to 97%, depending on the concentration (1 or 0.1%). However, most of them showed 100% inhibition of fungal growth in the two doses tested. Therefore, *in vitro* tests demonstrated a great potential of these compounds as agents of control of *L. fungicola* in the cultivation of *A. bisporus*.

Keywords: Dry bubble disease; *Agaricus bisporus*; mushroom; antifungal activity

Resumen

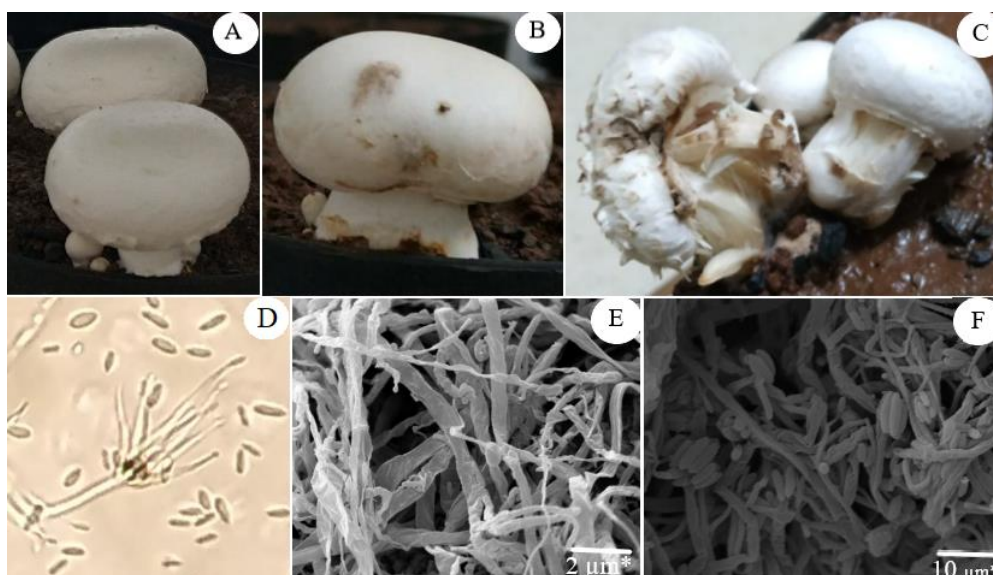
El hongo *Lecanicillium fungicola* es el agente causante de la burbuja seca en los champiñones (*Agaricus bisporus*), responsable de las pérdidas económicas. Este patógeno causa manchas y deformidades en los hongos, lo que los hace inviables para su comercialización. Su control se puede hacer con el uso de fungicidas, además de medidas de desinfección. Sin embargo, en Brasil, no hay legislación vigente para el uso de pesticidas en los cultivos de hongos, lo que impide su uso legal. Debido a esto, y la necesidad de evitar el uso de pesticidas, se han buscado alternativas naturales para el control de plagas y enfermedades. Los aceites esenciales han demostrado su acción antimicrobiana en varios estudios y, por lo tanto, pueden ser una buena alternativa para el control de *L. fungicola* en Brasil. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la acción antifúngica de diferentes aceites esenciales o compuestos principales sobre el crecimiento micelial de *L. fungicola*. Para ello, se probaron *in vitro* 13 aceites esenciales y nueve compuestos principales por su efecto sobre el crecimiento micelial del hongo, utilizando el método de difusión en medio de cultivo, en concentraciones de 1 y 0,1%. Algunos aceites o compuestos principales mostraron solo inhibición parcial, que varió de 62 a 97%, dependiendo de la concentración utilizada (0,1 o 1%). Sin embargo, la mayoría de ellos mostraron una inhibición del 100% del crecimiento de hongos en las dos dosis analizadas. Por lo tanto, las pruebas *in vitro* demostraron un gran potencial de estos compuestos como agentes de control de *L. fungicola* en el cultivo de *A. bisporus*.

Palabras clave: Enfermedad de la burbuja seca; *Agaricus bisporus*; hongos; actividad antifúngica.

1. Introdução

O fungo *Lecanicillium fungicola* é o agente causador da doença da bolha seca em cogumelos comestíveis, com destaque para a espécie *Agaricus bisporus*, causando perdas econômicas relevantes na fungicultura (Berendsen et al., 2010; Santana Nunes et al., 2017). A doença da bolha seca apresenta sintomas que variam de pequenas lesões necróticas a grandes deformidades disruptivas no píleo e no estipe, conforme apresentada na Figura 1. Essa patologia pode depreciar o preço de mercado do cogumelo a ponto de inviabilizar sua comercialização.

Figura 1. A: Cogumelos champignon (*A. bisporus*) saudáveis; B e C: champignon com sintomas da doença da bolha seca; D: imagem das estruturas morfológicas e esporos em microscópio óptico de *L. fungicola* (100x); E: Eletromicrografia de varredura de *A. bisporus* (2 μm); F: Eletromicrografia de varredura de *L. fungicola* (10 μm).



Fonte: Autores

No Brasil, a fungicultura não possui regulamentação para o uso de pesticidas no controle de pragas e doenças, conseqüentemente, os agrotóxicos são utilizados de forma indiscriminada nessa atividade. Desse modo, o controle é realizado com pesticidas sem recomendações acuradas de dosagem, do estágio mais adequado para uso e sem avaliação de possíveis impactos à saúde dos consumidores (Zied et al., 2015). Em função disso, a utilização de métodos alternativos, tais como o controle biológico e a utilização de produtos naturais, pode ser a melhor opção, especialmente para os produtores brasileiros, devido não haver regulamentação para o controle de pragas e doenças.

Os óleos essenciais possuem um grande potencial para o controle de patógenos. Essas substâncias são compostos voláteis, complexos e naturais, extraídos de plantas aromáticas. Esses metabólitos secundários são conhecidos por suas propriedades bactericida, antiviral, antifúngica, além de outras propriedades medicinais (Bakkali et al., 2008). Em função dessas propriedades, os óleos essenciais são amplamente utilizados para fins medicinais em diversas culturas há muitos anos. Recentemente, o uso dos óleos essenciais tem sido aplicado também na conservação de alimentos, além do uso clínico tradicional e na saúde (Donato et al., 2020).

Dentro desse contexto, a utilização de óleos essenciais em substituição aos agrotóxicos seria de grande valia para o mercado consumidor, cada vez mais consciente e exigente por alimentos saudáveis. Alicerçado no cenário exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar, *in vitro*, o potencial antifúngico de diferentes óleos essenciais e alguns compostos majoritários sobre o fungo *L. fungicola*.

2. Metodologia

2.1 Obtenção dos isolados de *Lecanicillium fungicola*

Dois dos três isolados de *L. fungicola* foram obtidos e isolados de cogumelos apresentando sintomas da doença, coletados diretamente do local de cultivo, localizado em Barbacena – MG. O terceiro isolado utilizado, foi cedido gentilmente pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Dracena.

Para o isolamento, foram cortados fragmentos de basidiocarpos que apresentavam sintomas da doença. Cada fragmento utilizado continha uma parte afetada e uma parte sadia. Os fragmentos foram tratados com álcool 70% por 30 segundos; posteriormente foram tratados com hipoclorito à 2% por um minuto e, por fim, lavados com água destilada estéril por 3x. Após os tratamentos de assepsia, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo papel de filtro seco esterilizado, para absorção do excesso de água. Oito fragmentos foram depositados equidistantes em cinco placas de Petri contendo o meio de cultura. Dois meios de cultura foram utilizados para o isolamento dos fungos: BDA (batata 200g/L, dextrose 20g/L e ágar 15g/L) e Ágar Malte (extrato de malte 20g/L e ágar 15g/L), ambos contendo os antibióticos cloranfenicol e estreptomicina, ambos a 50µg/mL. Após a transferência, as placas foram incubadas a

25°C até o crescimento do patógeno a partir dos fragmentos. As culturas obtidas foram transferidas para novas placas de Petri contendo BDA e, após a formação de conídios, lâminas foram preparadas para observação das estruturas reprodutivas assexuadas. Após a confirmação do gênero *Lecanicillium*, foram obtidas culturas monospóricas para a sequência do trabalho. Para isto, foi preparada uma suspensão de esporos em água destilada estéril. Após diluições sucessivas, alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas contendo ágar-ágar 2%. As placas foram observadas através de microscópio óptico e os conídios que se encontravam mais isolados foram transferidos unitariamente com auxílio de uma agulha para uma placa contendo meio Ágar Malte. Após o crescimento das culturas monospóricas, os isolados foram mantidos por meio de repicagens sucessivas em meio BDA e Ágar Malte e incubados a 25°C.

2.2 Identificação molecular

A massa micelial do fungo foi obtida em meio Caldo Malte, após inoculação com uma suspensão de 10^6 conídios/mL⁻¹, e incubação por 5 dias a 25° C, sob agitação de 100 RPM. A massa micelial foi filtrada e lavada com água destilada. A extração de DNA foi realizada com Kit Wizard Genomic DNA (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para amplificação da região ribossomal, utilizando-se como iniciadores os primers ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990).

2.3 Obtenção da suspensão de esporos para os ensaios

Placas com meio BDA foram inoculadas com um disco de cultura do fungo no centro da placa e incubadas a 25° C até a completa colonização. Para cada placa, foram adicionados 15 mL de água destilada estéril sobre a cultura do fungo. Os conídios foram raspados com auxílio de lâmina de vidro estéril e coletados com auxílio de micropipeta. Após contagem em câmara de Neubauer, a suspensão de esporos teve a sua população ajustada para se obter a concentração final de $1,6 \times 10^7$ esporos mL⁻¹. A suspensão foi armazenada a 4°C até ser utilizada.

2.4 Ensaio antifúngico *in vitro*

Os óleos essenciais foram adquiridos da empresa Ferquima[®] (Ind. e Com. Ltda) e estão descritos na Tabela 1, juntamente com os compostos majoritários (Sigma-Aldrich[®]): α -terpinol, Carvacrol, Citral, Eugenol puríssimo, Geraniol, Lilanol, Terpinen-4-ol, Timol e trans-Cinnamaldehyde 99%.

Como testemunhas (sem óleo essencial), foram realizados dois controles: o primeiro, com o crescimento do fungo somente no meio BDA e o segundo, com o desenvolvimento do fungo em meio BDA acrescido de Tween 80 a 0,5%, com o objetivo de avaliar a influência do surfactante sobre o crescimento do fungo. Portanto, cada experimento foi composto por 22 tratamentos (13 tipos de óleo essencial e 9 compostos majoritários) e duas testemunhas, com 5 repetições.

O óleo essencial foi adicionado ao meio BDA liquefeito após ser resfriado até 45°C, em volume suficiente para se obter a concentração desejada (1 ou 0,1%). Após homogeneização, o meio foi vertido em placas de Petri, as quais foram posteriormente inoculadas com um disco de 9 mm contendo o micélio de *L. fungicola* no centro de cada placa. As placas controle, sem adição de óleo essencial, foram inoculadas seguindo o mesmo procedimento. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C até a colonização da placa controle, ou seja, em torno de 15 dias. O diâmetro das colônias foi registrado diariamente por meio de um paquímetro digital. Os cálculos para determinação do efeito de inibição de cada óleo ou composto foram feitos com base no diâmetro das colônias em comparação ao controle. A porcentagem de inibição (PI) foi calculada conforme Billerbeck et al. (2001): $PI = (C - T / C - 9) \times 100$, sendo C= diâmetro médio do micélio no controle; T= diâmetro médio do micélio no tratamento.

2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CIM dos óleos essenciais sobre *L. fungicola* foi realizada por meio de microdiluição seriada em microplaca de 96 poços. As doses testadas foram definidas a partir dos resultados do teste *in vitro* descrito anteriormente.

Para cada dose testada, foram realizadas três repetições em caldo BD (batata e dextrose) 2x concentrado, contendo Tween 80 0,5% como surfactante. Como controle,

foi utilizado um tratamento sem óleo essencial. A microdiluição seriada em microplaca foi realizada adicionando 200 µL de meio BD acrescido do óleo essencial a ser testado a 1% em cada poço, na primeira linha (de 1 a 12), com exceção dos poços 1, 5 e 9. Foram realizadas diluições seriadas (partindo da linha A para H) com 100 µL da solução, desprezando 100 µL do último poço, de forma que todos os poços contivessem o mesmo volume (100 µL). Nas colunas 1, 5 e 9 foi adicionado apenas o meio BD e a suspensão de esporos como controle, sem óleo. Após a diluição seriada, foram adicionados 10 µL da suspensão de esporos de *L. fungicola* em cada poço. Por fim, as placas foram incubadas a 25°C por 1, 2, 3, 7 e 15 dias, com intervalos exatos de 24h.

Tabela 1. Nomenclatura das plantas de origem dos óleos essenciais utilizados.

Nome científico	Nome popular	Composto majoritários
<i>Citrus aurantifolia</i>	Limão Tahiti	Geranial, limoneno e β-pineno
<i>Cymbopogon martinii</i>	Palmarosa	Acetato de geranil e Geraniol
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Citronela	Citronelal, citronelol e geraniol
<i>Eugenia caryophyllus</i>	Cravo	Eugenol e β-cariofileno
<i>Eugenia caryophyllus</i> (folha)	Cravo folha	Eugenol e β-cariofileno
<i>Litsea cubeba</i>	Pimenta chinesa, May Chang	Sabineno, 1,8 – cineol, α-pineno e β-pineno
<i>Mentha arvensis</i>	Hortelã	Menthol e <i>p</i> - menthone
<i>Mentha piperita</i>	Hortelã-pimenta	Sabineno, limoneno, α-pineno e β-pineno e β-cariofileno
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjericão	Metilchavicol
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Carvacrol
<i>Piper nigrum</i>	Pimenta preta	Sabineno, limoneno, α-pineno e β-pineno e β-cariofileno
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Timol, <i>p</i> -Cymene e 1,8 – cineol
<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre	Canfeno, neral, geranial + acetato de bornila

Após o período de incubação, a interpretação dos resultados foi realizada por análise visual. A CIM foi definida como a menor concentração de óleo essencial em que

não ocorreu crescimento fúngico (Yamaguchi et al., 2011). Para determinar a CFM, foi realizado o subcultivo, transferindo 10 µL da cultura de cada poço negativo e do controle positivo em meio BDA, conforme Nakamura et al. (2016).

2.6 Análise estatística

As variáveis obtidas nos testes foram analisadas por meio do programa estatístico SISVAR[®], com análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, em delineamento experimental inteiramente casualizado, assim como para a interação (dose x tempo) (Ferreira, 2014).

3. Resultados e Discussão

Sequências ITS foram geradas para os três isolados (LTL01, LTL02, LTL03), as quais foram alinhadas e comparadas com as sequências ITS dos isolados de referência de espécies de *Lecanicillium*. Os três isolados se agruparam junto ao isolado tipo da espécie *L. fungicola* var. *aleophilum* (CBS 992.69 – Origem: Holanda). Portanto, os isolados utilizados neste trabalho pertencem à espécie *L. fungicola* var. *aleophilum*, comumente encontrada em cultivos de *Agaricus bisporus*.

Para avaliar o efeito dos óleos essenciais a 1% e do tempo de incubação sobre o crescimento micelial de *L. fungicola*, os testes foram realizados com as três cepas (LTL01, LTL02 e LTL03), descritas anteriormente. Nos resultados pode ser visto que houve efeito inibitório significativo dos diferentes óleos essenciais, o qual variou de acordo com o tempo de incubação, para alguns tipos de óleo, indicando que o efeito inibitório de alguns óleos está limitado a um período mais curto de tempo.

Conforme demonstrado na Tabela 2, a grande maioria dos óleos apresentou 100% de inibição sobre o crescimento micelial de *L. fungicola*. Dos 22 tratamentos, 20 apresentaram 100% de inibição na concentração de 1%, enquanto que, destes, apenas 14 apresentaram 100% de inibição na concentração de 0,1%.

Ao final do período de incubação (15 dias), observou-se que os óleos essenciais de *Piper nigrum* e *Zingiber officinale* apresentaram 62% e 65% de inibição, respectivamente.

Tabela 2. Inibição dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre o crescimento micelial de *L. fungicola* nas concentrações testadas.

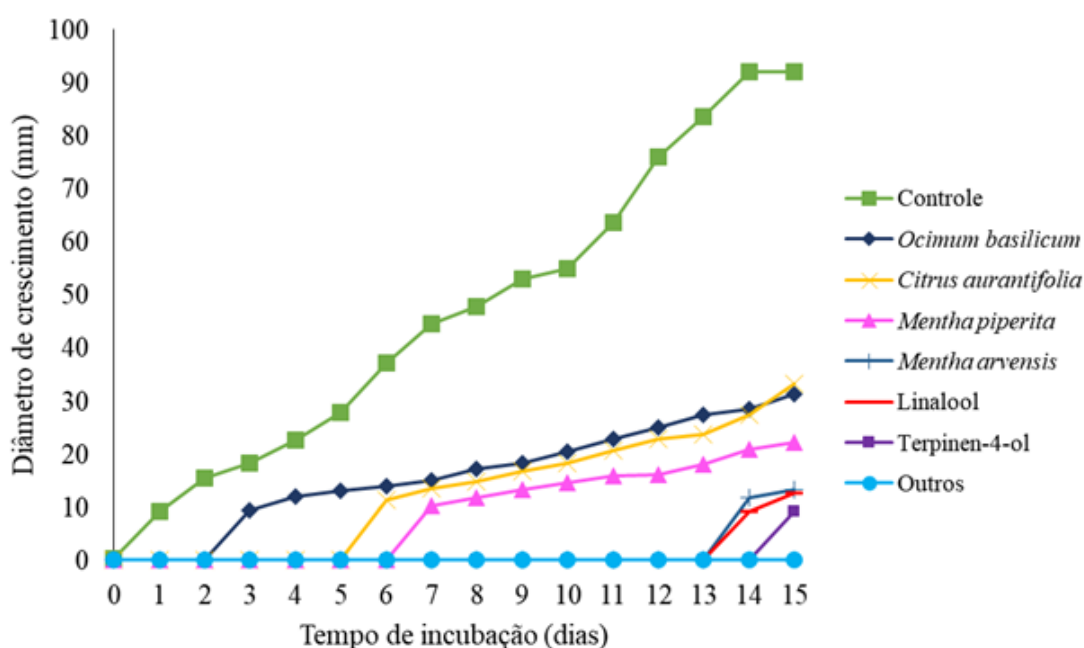
Espécie de origem do óleo ou componente principal	Concentração	
	1%	0,1%
α -terpinol	+	+
Carvacrol	+	+
Citral	+	+
<i>Citrus aurantifolia</i>	+	-
<i>Cymbopogon martinii</i>	+	+
<i>Cymbopogon winterianus</i>	+	+
<i>Eugenia caryophyllus</i>	+	+
<i>Eugenia caryophyllus</i> (folha)	+	+
Eugenol puríssimo	+	+
Geraniol	+	+
Lilanol	+	-
<i>Litsea cubeba</i>	+	+
<i>Mentha arvensis</i>	+	-
<i>Mentha piperita</i>	+	-
<i>Ocimum basilicum</i>	+	-
<i>Origanum vulgare</i>	+	+
<i>Piper nigrum</i>	-	-
Terpinen-4-ol	+	-
<i>Thymus vulgaris</i>	+	+
Timol	+	+
trans-Cinnamaldehyde 99%	+	+
<i>Zingiber officinale</i>	-	-

Analisando esses resultados, percebe-se a importância de, mesmo que um óleo já tenha sido testado em outros lugares, reavaliar o tratamento, uma vez que pode haver diferenças na constituição dos óleos, que sofrem alterações de acordo com as condições ambientais e até mesmo da forma e horário de coleta da planta, além da possibilidade de que uma determinada espécie apresente variações genéticas que levem a uma maior tolerância àquele produto. Portanto, para obter óleos essenciais de composição constante, Bakkali et al. (2008) sugerem que eles devem ser extraídos do mesmo modo, das mesmas partes das plantas que cresce no mesmo solo, em condições climáticas idênticas e colhidas na mesma estação.

3.1 Teste *in vitro* dos óleos essenciais, na concentração de 0,1%

A Figura 2 apresenta os resultados da dinâmica de crescimento micelial de *L. fungicola* e do efeito dos óleos ou de seus compostos majoritários. Ao contrário do que ocorreu com o controle, é possível observar que, em nenhum dos tratamentos, ocorreu o início imediato do crescimento micelial do fungo. O menor efeito inibitório foi observado no tratamento com o óleo essencial de *Ocimum basilicum*, para o qual observou-se início do crescimento micelial no 3º dia de incubação, seguido por *Citrus aurantifolia* e *Mentha piperita*, os quais inibiram o crescimento micelial conforme o gráfico, até 5º e 6º dias, respectivamente. Para *Mentha arvensis*, linalol e terpinen-4-ol, o crescimento micelial iniciou-se apenas a partir do 13º dia, mostrando um forte efeito inibitório sobre o crescimento do fungo. Não se sabe por que o fungo supera o efeito inibitório desses compostos após todo esse período de incubação. A possibilidade mais óbvia seria o efeito da volatilização do(s) composto(s) responsável(is) pela inibição do crescimento micelial, devido ao fato de que a principal característica dos óleos essenciais é serem constituídos por componentes voláteis e, com o passar do tempo, esses componentes volatizam. Poderia ser que, pelo menos, um desses compostos não seja um composto majoritário e acabe desaparecendo durante o período de incubação. Entretanto, se fosse apenas isso, o mesmo comportamento não seria observado para os compostos majoritários testados, o que não foi o caso, uma vez que dois deles também não apresentaram 100% de inibição na concentração de 0,1% (Tabela 2). Outra possibilidade poderia ser uma adaptação fisiológica do fungo ao composto. Entretanto, a adaptação fisiológica não deveria ser esperada, uma vez que o óleo essencial não tem um único alvo na célula, mas afeta vários alvos celulares ao mesmo tempo (Bakkali et al., 2008). Apesar disso, estes autores relataram um caso de resistência de *Bacillus cereus* ao composto carvacrol, após o crescimento da bactéria na presença de doses subletais. Portanto, apesar do acentuado efeito inibitório, provocando um grande retardo no início do crescimento micelial do patógeno, pode ser que a utilização desses compostos possa ser bastante limitada, em função dessas possibilidades. Evidentemente, para uma aplicação prática, isso poderia ser contornado por mais de uma aplicação durante o ciclo de cultivo. Entretanto, testes *in vivo* serão necessários para tal avaliação.

Figura 2. Dinâmica do crescimento micelial de *L. fungicola* sob o efeito dos óleos essenciais a 0,1%.



Fonte: Autores

Os óleos essenciais apresentam, geralmente, um amplo espectro de ação, proporcionando a inibição ou morte dos mais distintos gêneros de fungos e bactérias (Bakkali et al., 2008; Gogoi et al., 1997; Horváth et al., 2016; Lee et al., 2020; Sharma et al., 2017; Thielmann and Muranyi, 2019). Isso significa que estruturas comuns a todas as espécies como, por exemplo, a membrana plasmática, sejam afetadas, ou estruturas comuns a determinados grupos de microrganismos, como a membrana mitocondrial em eucariotos ou a bomba de prótons em procariotos (Bakkali et al., 2008). Este amplo espectro de ação traz um problema que é a dificuldade de encontrar um produto que seja mais específico, para não afetar outros organismos, como é o caso do cultivo de cogumelos. Neste caso, o ideal é que se tenha um óleo que iniba o patógeno, mas não a espécie de cogumelo cultivada. Considerando que o patógeno em questão e o cogumelo cultivado pertencem ao grupo dos fungos, isso pode ser mais complicado. Entretanto, há o atenuante de que as duas espécies pertencem a divisões distintas, Ascomycota e Basidiomycota, respectivamente. Neste contexto, a avaliação de diferentes tipos de óleos que contenham diferentes constituintes majoritários é essencial para se alcançar uma ação seletiva sobre o patógeno.

Para a grande maioria dos óleos, senão a sua totalidade, dois ou três componentes majoritários são responsáveis por mais de 50% da sua composição e, às vezes, apenas um componente corresponde a 50% ou mais da sua composição. Para o óleo essencial de *Litsea cubeba*, os compostos neral e geranial são os componentes majoritários, com 40,7 e 51,9%, respectivamente (Gogoi et al., 1997). Entretanto, esses valores são variáveis, provavelmente, em função de diferenças metodológicas, mas também em função das diferenças dos lotes de óleo utilizados, as quais são, por sua vez, oriundas das diferenças de cultivares, solo, clima, etc. Si et al. (2012) relataram para os mesmos componentes (neral e geranial) valores de 36,3 e 50%, respectivamente. No caso específico de *Litsea cubeba*, observa-se ainda uma grande diferença entre as partes da planta utilizadas para a extração do óleo. Segundo Jirovetz et al., (2006), eugenol foi o principal componente majoritário do óleo obtido a partir das folhas de *Litsea cubeba*. Para o óleo essencial de *C. winterianus*, citronelol, citronelal e geraniol são os principais componentes majoritários, com 10,1; 27 e 22,8%, respectivamente (Simic et al., 2008). Entretanto, para os mesmos componentes, Horváth et al. (2016) relataram os valores de 13,6; 36,2 e 25,3%, enquanto que Hamzah et al. (2014) encontraram um valor de 42,4% para o geraniol, o qual destacou-se como o principal componente majoritário. Esses resultados reforçam a necessidade contínua de retestar o efeito dos óleos essenciais, mesmo para os mesmos grupos de microrganismos. Posteriormente, a identificação de componentes majoritários com inibição seletiva sobre o patógeno poderá trazer uma contribuição ainda maior sobre a utilização dos óleos essenciais como uma alternativa de controle de pragas e doenças no cultivo de cogumelos. Entretanto, isso vai depender do custo que isso poderá representar.

No trabalho de Santos et al. (2017), a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Thymus vulgaris* encontrada para o controle de *L. fungicola* foi de 0,8%. Este valor é superior à dose encontrada neste trabalho, uma vez que a concentração de 0,1% do óleo essencial de *Thymus vulgaris* inibiu completamente o crescimento de *L. fungicola*. Geösel et al. (2014) testaram a concentração de 0,015% do óleo essencial de tomilho contra *L. fungicola* e após 10 dias de observação, observou-se um crescimento micelial de 34 mm.

3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Este ensaio foi realizado a partir dos óleos essenciais que apresentaram 100% de inibição do crescimento micelial de *L. fungicola* na concentração de 0,1%. A CIM é muito importante para a obtenção da maior eficácia possível no controle do patógeno, sem afetar o cogumelo e ao menor custo possível. Não se observou crescimento micelial nas microplacas até 72h de incubação (3 dias). Em função disso, as primeiras observações de crescimento micelial foram feitas a partir do período de 7 dias de incubação (Tabela 3), de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

O óleo essencial de *L. cubeba* foi o que apresentou os melhores resultados de CIM e CFM, seguido por *E. caryophyllus* (folha), *E. caryophyllus* (cravo) e *Cymbopogon martinii*, todos com uma CIM $\geq 0,0312\%$. Para os óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris*, observou-se a CIM no dobro da concentração. Apesar disso, esses resultados representam uma eficiência maior em comparação aos resultados de Santos et al. (2017), cuja CIM observada foi de 0,8%. Geösel et al. (2014) testaram a concentração de 0,015% do óleo essencial de *T. vulgaris*, entretanto, essa concentração não foi suficiente para inibir completamente o crescimento micelial do fungo.

Tabela 3. Resultados de CIM e CFM para os óleos essenciais testados para o controle das três de *L. fungicola* (LTL01, LTL02 e LTL03).

Óleos essenciais	CIM		CFM
	7 dias	15 dias	5 dias
<i>Cymbopogon winterianus</i>	$\geq 0,125\%$	$\geq 0,125\%$	$\geq 0,25\%$
<i>Cymbopogon martinii</i>	$\geq 0,0312\%$	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,125\%$
<i>Eugenia caryophyllus</i>	$\geq 0,0312\%$	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,0625\%$
<i>Eugenia caryophyllus</i> folha	$\geq 0,0312\%$	$\geq 0,0312\%$	$\geq 0,125\%$
<i>Litsea cubeba</i>	$\geq 0,0156\%$	$\geq 0,0156\%$	$\geq 0,0312\%$
<i>Mentha arvensis</i>	$\geq 0,125\%$	$\geq 0,5\%$	$\geq 0,5\%$
<i>Origanum vulgare</i>	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,0625\%$
<i>Thymus vulgaris</i>	$\geq 0,0625\%$	$\geq 0,125\%$	$\geq 0,125\%$

Os índices CIM/CFM são extremamente importantes para a escolha das melhores opções visando uma aplicação comercial dos óleos essenciais. Entretanto, junto com a CIM/CFM, é necessário avaliar também o preço do produto comercial para definir o custo relativo de cada produto. Para os 4 óleos com os melhores índices (*L. cubeba*, *E. caryophyllus* – folha, *E. caryophyllus* e *C. martinii*), *C. martinii* foi o de maior custo no mercado (R\$1040,00 – 100 mL), seguido por *E. caryophyllus* (R\$840,00), *L. cubeba* (R\$756,00) e *E. caryophyllus* – folha (R\$567,00). É interessante observar que o óleo de *E. caryophyllus* – folha apresentou menor preço e menor CIM quando comparado com o óleo de *E. caryophyllus*, após 15 dias de incubação.

Considerando os preços observados no mercado brasileiro e os índices CIM/CFM observados, os cálculos mostraram que, apesar de não ser o óleo mais barato, *L. cubeba* apresentou o menor custo relativo, despontando como uma das principais opções para o controle de *L. fungicola*. Entretanto, estudos futuros deverão avaliar ainda a efetividade deste óleo nas condições de cultivo do cogumelo.

4. Conclusões

Os resultados mostram que os óleos essenciais testados têm ação contra o *L. fungicola*, dos 13 diferentes óleos essenciais testados *L. Cubeba* foi o mais efetivo, com $CIM \geq 0,0156\%$ e $CFM \geq 0,0312\%$, seguido por *E. caryophyllus* e *O. vulgare*, com valores de CIM e CFM $\geq 0,0625\%$. Portanto, a maioria dos óleos essenciais testados foi efetiva contra *L. fungicola* e alguns deles podem ser utilizados como alternativas eficientes para combater a doença causada por este fungo.

5. Referências

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Berendsen, R. L., Baars, J. J. P., Kalkhove, S. I. C., Lugones, L. G., Wösten, H. A. B., & Bakker, P. A. H. M. (2010). *Lecanicillium fungicola*: Causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular Plant Pathology*, 11(5), 585–595.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00627.x>
- Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 639–649. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>
- Císarová, M., Tančinová, D., Medo, J., & Kačániová, M. (2016). The in vitro effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(10), 668–674.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1191887>
- de Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), 9–17. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-1-9>
- Donato, R., Sacco, C., Pini, G., & Bilia, A. R. (2020). Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 249, p. 112376). Elsevier Ireland Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112376>
- Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, 38(2), 109–112.
<https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- Geösel, A., Szabó, A., Akan, O., & Szarvas, J. (2014). *Effect of Essential Oils on*

Mycopathogens of Agaricus. 530–535.

Gogoi, P., Baruah, P., & Nath, S. C. (1997). Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* pers. *Journal of Essential Oil Research*, 9(2), 213–215.

<https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9699462>

Hamzah, M. H., Che Man, H., Abidin, Z. Z., & Jamaludin, H. (2014). Comparison of citronella oil extraction methods from *Cymbopogon nardus* grass by ohmic-heated hydro-distillation, hydro-distillation, and steam distillation. *BioResources*, 9(1), 256–272.

<https://doi.org/10.15376/biores.9.1.256-272>

Horváth, G., Török Jenei, J., Vágvölgyi, C., Böszörményi, A., & Krisch, J. (2016).

Effects of essential oil combinations on pathogenic yeasts and moulds. *Acta Biologica Hungarica*, 67(2), 205–214. <https://doi.org/10.1556/018.67.2016.2.8>

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6303–6307.

<https://doi.org/10.1021/jf060608c>

Lee, L. T., Garcia, S. A., Martinazzo, A. P., & Teodoro, C. E. D. S. (2020).

Fungitoxidade e composição química do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre o *Aspergillus flavus*. *Research, Society and Development*, 9(8), 202985628.

<https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5628>

Nakamura, M., Endo, E., de Sousa, J. P., Callejon, D., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B., de Freitas, O., Nakamura, C., & Lopes, N. (2016). Copaiba Oil and Its Constituent Copalic Acid as Chemotherapeutic Agents against Dermatophytes.

Journal of the Brazilian Chemical Society, 28(8), 1377–1383.

<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160309>

Pandey, A. K., Rai, M. K., & Acharya, D. (2003). Chemical Composition and Antimycotic Activity of the Essential Oils of Corn Mint (*Mentha arvensis*) and Lemon Grass (*Cymbopogon flexuosus*) Against Human Pathogenic Fungi.

Pharmaceutical Biology, 41(6), 421–425.

<https://doi.org/10.1076/phbi.41.6.421.17825>

- Santana Nunes, J., Rocha de Brito, M., Cunha Zied, D., Aparecida das Graças Leite, E., Souza Dias, E., & Alves, E. (2017). Evaluation of the infection process by *Lecanicillium fungicola* in *Agaricus bisporus* by scanning electron microscopy. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1), 36–42.
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.04.006>
- Santos, T. L. dos, Belan, L. L., Zied, D. C., Dias, E. S., Alves, E., Santos, T. L. dos, Belan, L. L., Zied, D. C., Dias, E. S., & Alves, E. (2017). Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. *Ciência Rural*, 47(5).
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160780>
- Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., & Kundu, B. (2017). 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*, 123(3), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>
- Si, L., Chen, Y., Han, X., Zhan, Z., Tian, S., Cui, Q., & Wang, Y. (2012). Chemical composition of essential oils of *Litsea cubeba* harvested from its distribution areas in China. *Molecules*, 17(6), 7057–7066.
<https://doi.org/10.3390/molecules17067057>
- Simic, A., Rančić, A., Sokovic, M. D., Ristic, M., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., & Marin, P. D. (2008). Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, 46(6), 437–441. <https://doi.org/10.1080/13880200802055917>
- Thielmann, J., & Muranyi, P. (2019). Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene. *Journal of Essential Oil Research*, 31(5), 361–378.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1611671>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*, 1, 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yamaguchi, M. U., Garcia, F. P., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D.,

& Nakamura, C. V. (2011). Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3), 507–514.
<https://doi.org/10.1007/s10482-010-9516-3>

Zied, D. C., Nunes, J. S., Nicolini, V. F., Gimenez, A. P., Rinker, D. L., & Dias, E. S. (2015). Tolerance to *Lecanicillium fungicola* and yield of *Agaricus bisporus* strains used in Brazil. *Scientia Horticulturae*, 190, 117–122.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.04.021>

Artigo Científico

Artigo 2: Atividade antagonista de *Bacillus* spp. sobre *Lecanicillium fungicola* por diferentes métodos

Artigo científico submetido para o periódico: **Acta Brasiliensis**

Resumo

A doença da bolha seca é uma das doenças mais relevantes no cultivo de *Agaricus bisporus*, causada pelo fungo *Lecanicillium fungicola*. Em função da falta de regulamentação do uso de pesticidas para a cultura no Brasil, tem-se buscado métodos eficientes para o controle desta doença. O controle biológico pode ser uma alternativa, entretanto, a eficácia desse controle depende da seleção de cepas com propriedades antagonistas. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antagonista *in vitro* de dois isolados de bactérias (*Bacillus* sp. - M17 e *Bacillus* sp. - M18), isoladas de cogumelos champignon. Essas bactérias foram testadas sobre quatro isolados de *L. fungicola* utilizando-se quatro métodos distintos: cultura pareada, patógeno sobre o antagonista, compostos voláteis e compostos termoestáveis. Todos os métodos foram comparados com o tratamento controle. Em todos os métodos, os dois isolados bacterianos apresentaram atividade antagonista e, dentre os métodos testados, o que apresentou maior porcentagem de inibição foi o do patógeno sobre o antagonista. Esses resultados sugerem que os isolados bacterianos e seus efeitos antagônicos sobre *L. fungicola* podem ser promissores no desenvolvimento de um produto comercial para o controle biológico de *L. fungicola* no cultivo do cogumelo *A. bisporus*, podendo tornar-se uma alternativa ao uso dos pesticidas químicos.

Palavras-chaves: Champignon, Cogumelo, Controle biológico, Doença da bolha seca.

Abstract

Dry bubble disease is one of the most relevant diseases in the cultivation of the button mushroom (*Agaricus bisporus*) in Brazil, caused by *Lecanicillium fungicola*. Due to the lack of regulation of the use of pesticides for mushroom cultivation in Brazil, efficient methods have been sought to control this disease. Biological control may be an alternative, however, the effectiveness of this control depends on the selection of strains with antagonistic properties. In this context, the objective of this work was to evaluate the antagonistic effect *in vitro* of two bacterial isolates (*Bacillus* sp. - M17 and *Bacillus* sp. - M18), obtained from fresh button mushrooms. These bacteria were tested on four isolates of *L. fungicola* using four different methods: paired culture, pathogen on the antagonist, volatile compounds and thermostable compounds. All methods were compared with the control treatment. In all methods, the two bacterial isolates showed antagonist activity and, among the tested methods, the one with the highest percentage of inhibition was that of the pathogen over the antagonist. These results suggest that bacterial isolates and their antagonistic effects on *L. fungicola* may be promising in the development of a commercial product for the biological control of *L. fungicola* in the cultivation of *A. bisporus*, and may become an alternative to the use of chemicals pesticides.

Keys-words: Biological control, Button mushroom, Dry bubble disease, Mushroom.

1. Introdução

Os cogumelos são uma cultura alimentar de grande importância para milhares de pessoas em todo o planeta. O champignon (*Agaricus bisporus*) é um dos cogumelos mais cultivados no mundo, sendo considerado um exemplo de produção sustentável, devido ao fato de seu cultivo ser realizado em substratos produzidos a partir de resíduos agrícolas, como palha de trigo, bagaço de cana e outros (Kertesz & Thai, 2018).

O cultivo normalmente ocorre em substrato orgânico obtido por um processo de compostagem, seguido de pasteurização (Figueiredo & Dias, 2014). O composto assim preparado é inoculado com o micélio de *A. bisporus* e incubado a temperatura ambiente (~25 °C) até a sua completa colonização. Ao composto colonizado, é adicionada uma camada de cobertura, normalmente à base de solo ou turfa de musgo, para manter o composto em condições ambientais ideais e para favorecer a produção de cogumelos (Dias, 2010).

Existe uma ampla comunidade microbiana no substrato e na camada de cobertura, que desempenham papel importante inclusive na indução da frutificação de *A. bisporus* (McGee, 2018). Entretanto, essa microbiota pode abrigar também patógenos ou microrganismos competidores, os quais podem trazer prejuízos na produção. Por isso, tanto o composto como a camada de cobertura passam por processos de pasteurização ou desinfestação para eliminar esses microrganismos indesejáveis.

Entretanto, além do substrato de cultivo e da camada de cobertura, patógenos podem vir de outras fontes, inclusive veiculados por insetos vetores. Um desses patógenos é o fungo *Lecanicillium fungicola*, causador da doença da bolha seca. No Brasil não há pesticidas registrados pelo Ministério da Agricultura para o controle de pragas e doenças no cultivo de cogumelos. Apesar disso, há relatos de que produtos registrados para outras culturas sejam utilizados no cultivo de cogumelos, em função da falta de opções viáveis (Zied et al., 2015). Os sintomas causados pela doença da bolha seca variam desde pequenas lesões necróticas a cogumelos deformados, sendo que os sintomas e a gravidade da doença dependem do período da infecção, o que impacta diretamente o nível das perdas econômicas (Berendsen et al., 2010).

A utilização de antagonistas naturais no combate de pragas ou doenças é uma estratégia de grande potencial. Este tipo de abordagem favorece a produção de alimentos

mais saudáveis, além de minimizar problemas ambientais e de saúde, normalmente causados pela utilização de pesticidas químicos. Portanto, o controle biológico deve ser sempre considerado como uma das alternativas para substituir os agrotóxicos. Diversos produtos à base de bactérias do gênero *Bacillus* já foram disponibilizados para comercialização como pesticidas biológicos. Biopesticidas à base de *Bacillus* já são utilizados em vários setores da agricultura convencional (Pérez-García et al., 2011) e podem, portanto, ser uma das opções para o cultivo de cogumelos no Brasil.

Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antagonista de dois isolados de *Bacillus* spp., obtidos a partir de cogumelos frescos de *A. bisporus*, contra quatro diferentes cepas de *L. fungicola* por diferentes métodos.

2. Metodologia

2.1 Obtenção dos isolados de *Lecanicillium fungicola*

O isolado LTL02 foi gentilmente cedido pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Dracena. Os isolados (LTL01 e LTL03) de *L. fungicola* foram obtidos a partir do isolamento de cogumelos *A. bisporus* com sintomas da doença, coletados diretamente do local de cultivo, localizado em Barbacena – Minas Gerais, Brasil. Para realizar o isolamento a partir dos cogumelos foram selecionados aqueles com sintomas típicos da doença, porém, ainda em bom estado fisiológico, para minimizar a presença de saprófitos. Os cogumelos foram acondicionados em sacos de papel e levados para o laboratório. Após lavar os basidiocarpos em água corrente para remoção das sujidades, foram cortados fragmentos do basidiocarpo que apresentavam sintomas da doença, cada fragmento contendo uma parte afetada e uma parte sadia. Os fragmentos foram submetidos ao procedimento de assepsia: 30 segundos em álcool 70%, posteriormente um minuto em hipoclorito 2% e, por fim, lavados em água destilada estéril por 3x e transferidos para placa com papel filtro, com o intuito de remover o excesso de água. Oito fragmentos foram depositados equidistantes em placas de Petri contendo o meio de cultura, sendo utilizados BDA e Extrato de Malte 2%, ambos contendo cloranfenicol (0,05g/L) e estreptomicina (0,05g/L). As placas foram incubadas em B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) à 25°C. Em seguida, os isolados de *L. fungicola* foram purificados e a identificação da espécie foi confirmada por taxonomia clássica e por sequenciamento da região ribossomal. O isolado LTL04 foi isolado de cogumelos coletados de produção

comercial da região de Domingos Martins, Espírito Santo – Brasil, segundo a mesma técnica de isolamento e a identificação.

2.3 Obtenção de culturas monospóricas de *L. fungicola*

Após a confirmação da presença das estruturas reprodutivas assexuadas, foi preparada uma suspensão de esporos em solução salina 0,85% a partir de fragmentos da colônia. Após diluições sucessivas e contagem em câmara de Neubauer, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para placa com ágar-ágar (20g de ágar/L) e espalhada com auxílio de alça de Drigalsky. Com o auxílio de microscópio óptico, conídios que se encontravam mais isolados foram transferidos unitariamente com auxílio de uma agulha para uma placa contendo meio ágar malte.

2.4 Identificação molecular

A massa micelial do fungo foi obtida em meio caldo malte 2%, inoculado com uma suspensão de conídios (10^6 ml^{-1}), e incubado por 5 dias a 25° C, sob agitação de 100 RPM. A massa micelial foi filtrada e lavada com água destilada. A extração de DNA foi realizada com utilização do Kit Wizard Genomic DNA (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para amplificação da região ribossomal, utilizando-se como iniciadores os primers ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White et al., 1990).

2.5 Isolamento de bactérias a partir de basidiocarpos de *A. bisporus*

As amostras foram obtidas de local de cultivo de champignon, no município de Andradas – MG, sendo transportadas à temperatura ambiente até o laboratório. Foram selecionados cogumelos com sintomas causados por *L. fungicola*. As amostras foram armazenadas em câmara fria (4-8° C) até o momento do processamento. Para o isolamento de bactérias a partir do basidiocarpo, foram cortados fragmentos com partes sadias e acometidas pela doença, esses fragmentos foram depositados de forma equidistante em placas de Petri com os meios Ágar Nutriente e BDA. Parte das amostras foi submetida ao

procedimento de assepsia, conforme descrito no item 2.1, enquanto que outra parte foi transferida direto para as placas, as quais foram incubadas em B.O.D a 25°C. Posteriormente, os isolados foram submetidos à purificação e identificação.

Os isolados bacterianos que passaram previamente pelas técnicas de identificação fenotípica, posteriormente foram identificados utilizando-se um sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex-Bruker Daltonik/ BioTyper™). Uma cepa de *Escherichia coli* K12 foi utilizada como padrão para calibração externa do equipamento, de acordo com a metodologia proposta por Lima-Neto et al. (2014), sendo que as células foram cultivadas em meio ágar nutriente por 18h a 25°C.

2.6 Métodos de avaliação de atividade antagonista

Após a identificação, foram selecionados dois isolados de *Bacillus* spp. para avaliar a atividade antagonista sobre *L. fungicola*. Quatro métodos de avaliação foram utilizados, de acordo com Sobrinho et al. (2018) com modificações. No primeiro método, utilizou-se a técnica de cultura pareada. Nesta técnica, um disco de BDA de 9 mm de diâmetro, colonizado pelo fungo *L. fungicola*, foi colocado a 1,5 cm de distância da borda esquerda de uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio BDA e, com o auxílio de uma alça de inoculação, uma estria simples da cepa de *Bacillus* sp. foi feita do lado direito, a 1,5 cm de distância da borda da placa.

Um segundo método consistiu no cultivo do patógeno sobre a cultura do antagonista. Para isto, uma placa de Petri com meio BDA foi estriada com *Bacillus* sp., e imediatamente um disco de 9 mm de meio BDA, colonizado por *L. fungicola* foi transferido para o centro da placa de Petri.

Em um terceiro método, avaliou-se a inibição do crescimento de *L. fungicola* por meio da produção de metabólitos termoestáveis por *Bacillus* sp. Para tanto, placas de Petri, contendo 20 mL de meio BDA, foram estriadas com *Bacillus* sp. e incubadas em câmara de B.O.D à 25°C por 48 horas, no escuro. Após este período as placas foram autoclavadas a 121 °C por 15 minutos e em seguida acondicionadas em câmara de fluxo laminar para solidificação do meio em ambiente asséptico. Após a solidificação do meio,

discos de meio BDA colonizados por *L. fungicola* foram colocados no centro das placas para posterior avaliação do crescimento.

No quarto método, a atividade antagonista foi avaliada por meio da produção de metabólitos voláteis. Este método consistiu na sobreposição de bases de placas de Petri, contendo meio BDA, inoculado com discos de meio BDA, medindo 9 mm de diâmetro, colonizado por *L. fungicola*, sobre bases de placas de Petri, contendo meio BDA, estriado com *Bacillus* sp. Como tratamento controle, discos de meio BDA, colonizados pelos isolados de *L. fungicola*, foram adicionados no centro de placas de Petri contendo apenas meio BDA.

Todos os tratamentos foram incubados escuro à temperatura constante de 25 °C. A avaliação consistiu em medir, com o auxílio de paquímetro digital, o diâmetro médio das colônias de *L. fungicola*, 15 dias após as inoculações, período em que, um dos isolados no tratamento controle, atingiu o crescimento total na placa. O diâmetro das colônias foi registrado a cada 48h. O tamanho da colônia de cada amostra teste foi comparado com a dimensão dos controles. Os resultados foram expressos em termos de tamanho do diâmetro do halo do crescimento microbiano. A porcentagem de inibição do número de colônias (PI) foi calculada conforme Billerbeck et al. (2001), de acordo com a equação: $PI = (C - T / C - 9) \times 100$, sendo: C = diâmetro médio do micélio no controle; T = diâmetro médio do micélio no tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 4x5 (quatro isolados de *L. fungicola*, quatro métodos de avaliação do antagonismo + um tratamento controle) com cinco repetições. As variáveis obtidas nos testes foram analisadas por meio do programa estatístico SISVAR[®], com análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância (Ferreira, 2014).

3. Resultados e discussão

Dos 28 isolados bacterianos obtidos, foi possível fazer identificação apenas dos gêneros, sendo todos identificados como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. Para o presente trabalho, foram utilizados apenas os isolados de *Bacillus*. De acordo com os resultados obtidos, foram observadas diferenças significativas tanto entre

as cepas, como para os métodos de avaliação e ainda uma interação entre cepas e métodos. O crescimento micelial das quatro cepas de *L. fungicola* testadas foram inibidas significativamente pelas duas cepas de *Bacillus* sp, quando comparadas ao tratamento controle (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro médio de crescimento micelial (DM) e porcentagem de inibição (PI) das diferentes cepas de *L. fungicola*, submetidos a diferentes métodos de antagonismo de diferentes cepas de *Bacillus* sp.

Antagonista	Fungo	Controle		Cultura Pareada		Patógeno sobre o Antagonista		Compostos voláteis		Compostos Termoestáveis	
		DM (mm)	DM (mm)	PI (%)	DM (mm)	PI (%)	DM (mm)	PI (%)	DM (mm)	PI (%)	
<i>Bacillus</i> sp. (M17)	01	66	38,3	41b	21,8	72a	33,5	50b	16,8	81a	
	02	63	39,8	40b	14,1	87a	32,1	54b	18,5	79a	
	03	78	40,3	51b	15	88a	35,1	58b	26,8	71a	
	04	65	36	48b	11,5	92a	36,8	46b	21	75a	
CV= 16,80											
<i>Bacillus</i> sp. (M18)	01	66	35,5	46c	22,3	71b	34,1	49c	21	74b	
	02	63	27,1	63c	13,1	89a	45	31c	20,6	75b	
	03	78	38,8	53c	13,1	91a	43,5	46c	24,1	75b	
	04	65	36,3	47c	0	100a	32,3	54c	20,5	76b	
CV= 16,53											

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. (DM: diâmetro médio, PI: porcentagem de inibição).

O método de antagonismo em que as cepas de *Bacillus* sp. promoveram as maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial dos isolados de *L. fungicola* foi: Patógeno sobre o Antagonista, a cepa *Bacillus* sp. (M17) apresentou inibição entre 72 e 92%, a cepa *Bacillus* sp. (M18) apresentou inibição de 71 a 100%, como apresentado na Figura 1.

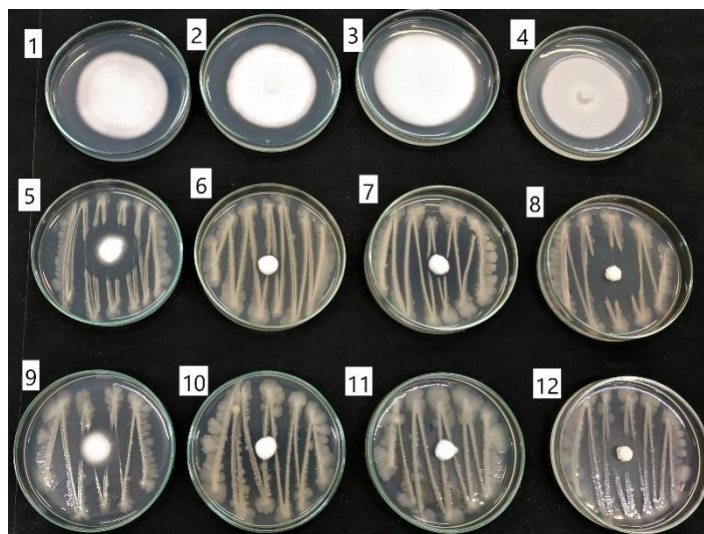


Figura 1. Antagonismo pelo método de patógeno sobre o antagonista entre cepas de *Bacillus* sp. (M17) (placas 5, 6, 7 e 8), e *Bacillus* sp. (M18) (placas 9, 10, 11 e 12) sobre diferentes cepas de *L. fungicola*: LTL01 (placas 1, 5 e 9), LTL02 (placas 2,6 e 10), LTL03 (placas 3,7 e 11) e LTL04 (placas 4, 8 e 12), como Controle (placas 1, 2, 3 e 4).

O objetivo deste trabalho era avaliar o efeito inibitório de *Bacillus* contra *L. fungicola*, entretanto, observou-se um efeito inibitório recíproco. É possível observar a inibição do crescimento micelial de *L. fungicola* pelas duas cepas de *Bacillus*, uma vez que as culturas fúngicas não conseguiram crescer senão apenas alguns milímetros. Para LTL04, observou-se uma inibição mais severa, uma vez que o crescimento do fungo restringiu-se praticamente ao disco inoculado na placa. LTL01 foi a cepa de *L. fungicola* que apresentou maior crescimento micelial, entretanto, a inibição do crescimento micelial é bastante evidente, quando comparado ao controle. Não se observou diferenças entre as duas cepas de *Bacillus*, uma vez que os fungos apresentaram o mesmo padrão de crescimento na presença das duas cepas bacterianas. Além do efeito inibitório das bactérias sobre *L. fungicola*, ficou muito claro também que este fungo produz metabólitos que inibem o crescimento das culturas de *Bacillus* utilizadas neste trabalho. Entretanto, este efeito foi observado apenas para as cepas LTL01 e LTL04 de *L. fungicola*. Além disso, observou-se que o halo de inibição foi maior para a cepa M17 em comparação à cepa M18 de *Bacillus*. É interessante observar que, para *L. fungicola* LTL04, para o qual o crescimento micelial foi mínimo, o halo de inibição sobre a foi evidente. Isso demonstra que uma elevada atividade metabólica de antagonismo à bactéria, sendo possível que os metabólitos inibitórios vieram do disco inoculado na placa, uma vez que o crescimento micelial foi quase nulo. Considerando que esses organismos estão presentes naturalmente

no solo, é natural que ambos tenham desenvolvido mecanismos de antagonismo entre si. Por isso, o solo é uma fonte comum na busca de novos microrganismos produtores de metabólitos de potencial farmacêutico. Neste contexto, a cepa LTL04 poderia ser melhor avaliada com respeito à produção destes metabólitos para o controle de outros microrganismos, em especial para o controle de doenças do solo que acometem o sistema radicular das plantas.

O segundo método que permitiu observar maior porcentagem de inibição das diferentes cepas de *L. fungicola* foi o método de utilização de compostos termoestáveis. De acordo com este método, observou-se que *Bacillus* sp. M17 apresentou inibição entre 71 e 81% sobre *L. fungicola*, enquanto que, para a cepa M18, este efeito variou de 74 a 76% (Figura 2). Apesar desses resultados serem muito interessantes, novos ensaios deverão ser conduzidos utilizando culturas líquidas, as quais, após a autoclavagem possam ser purificadas e aplicadas em meios de cultivo novos, para evitar a interferência de outros fatores, uma vez um meio de cultura sólido autoclavado, pode ter sofrido muitas alterações, tornando o cultivo do fungo inviável.

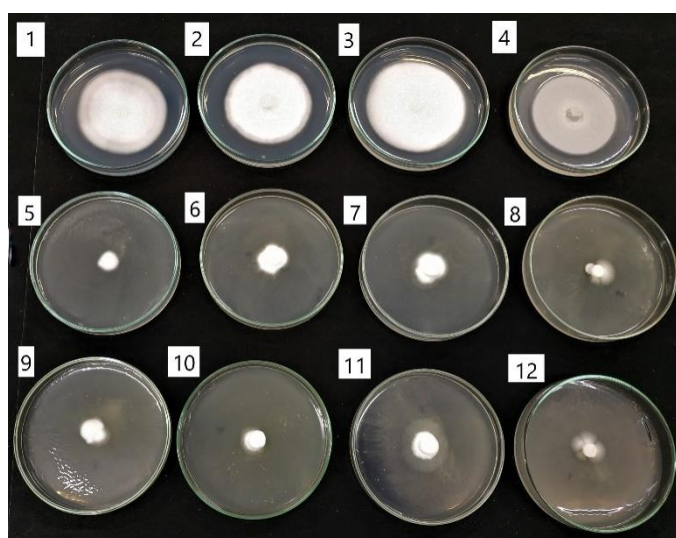


Figura 2. Antagonismo pelo método de compostos termoestáveis entre cepas de *Bacillus* sp. (M17) (placas 5, 6, 7 e 8), e *Bacillus* sp. (M18) (placas 9, 10, 11 e 12) sobre diferentes cepas de *L. fungicola*: LTL01 (placas 1, 5 e 9), LTL02 (placas 2, 6 e 10), LTL03 (placas 3, 7 e 11) e LTL04 (placas 4, 8 e 12), como Controle (placas 1, 2, 3 e 4).

O método de antagonismo por culturas pareadas apresentou inibição de 40 a 51% para a cepa *Bacillus* sp. (M17), enquanto que a cepa *Bacillus* sp. (M18) apresentou inibição entre 46 e 63% sobre *L. fungicola* (Figura 3).

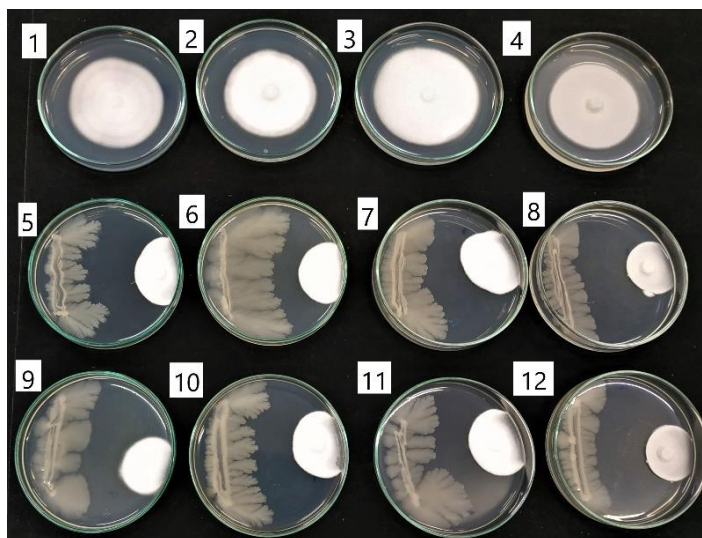


Figura 3. Antagonismo pelo método de cultura pareada entre cepas de *Bacillus* sp. (M17) (placas 5, 6, 7 e 8), e *Bacillus* sp. (M18) (placas 9, 10, 11 e 12) sobre diferentes cepas de *L. fungicola*: LTL01 (placas 1, 5 e 9), LTL02 (placas 2,6 e 10), LTL03 (placas 3,7 e 11) e LTL04 (placas 4, 8 e 12), como Controle (placas 1, 2, 3 e 4).

A inibição encontrada pelo método de compostos voláteis sobre as diferentes cepas de *L. fungicola* para *Bacillus* sp. (M17) variou entre 46 e 58% e os valores encontrados para *Bacillus* sp. (M18) foi entre 31 e 54% (Figura 4).

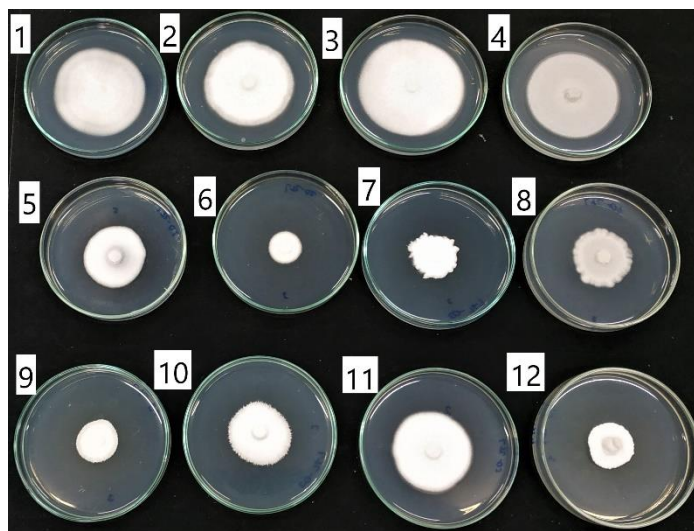


Figura 4. Antagonismo pelo método de compostos voláteis entre cepas de *Bacillus* sp. (M17) (placas 5, 6, 7 e 8) e *Bacillus* sp. (M18) (placas 9, 10, 11 e 12) sobre diferentes cepas de *L. fungicola*: LTL01 (placas 1, 5 e 9), LTL02 (placas 2,6 e 10), LTL03 (placas 3,7 e 11) e LTL04 (placas 4, 8 e 12), como Controle (placas 1, 2, 3 e 4).

As quatro cepas de *L. fungicola* tiveram seu crescimento micelial inibido pelas duas cepas de *Bacillus* sp. Em todos os métodos testados, a porcentagem de inibição variou em função do método utilizado e das cepas tanto de fungos como de bactérias. Os resultados obtidos demonstram a ação antagonista de *Bacillus* sp. sobre o fungo *L. fungicola*, concordando com os resultados de Stanojević et al. (2019). Os autores avaliaram 33 cepas de *Bacillus* spp. isoladas do substrato de cogumelos, através do método de cultura pareada e encontraram porcentagem de inibição variando de 32 a 88%. Segundo os autores, apesar das variações, todas as cepas testadas apresentaram algum efeito de inibição do crescimento do patógeno. Riahi, Hashemi, e Sharifi, (2012), também testaram três bactérias isoladas de substrato de cogumelos quanto ao seu efeito antagônico sobre o crescimento de *L. fungicola*, e observaram que cepas de *Bacillus* sp. apresentaram efeito inibitório que variou entre 55 a 61%.

Dentre os métodos avaliados, o que mostrou maior inibição das cepas de *L. fungicola* foi o método do patógeno sobre o antagonista, sendo que *Bacillus* sp. (M18) apresentou 100% de inibição sobre *L. fungicola* LTL04. Vários estudos relataram a atividade antagonista de cepas de *Bacillus* sp. isoladas de cogumelos e substrato de *A. bisporus* sobre fungos patogênicos (Liu et al.; 2015; Milijašević-Marčić et al., 2017; Stanojevic et al., 2016).

De acordo com o teste de antagonismo pelo método de compostos termoestáveis, os metabólitos produzidos pelas duas cepas de *Bacillus* sp. sobreviveram ao processo de autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Considerando que estes compostos mantiveram as suas propriedades antifúngicas, os mesmos podem ser considerados metabólitos termoestáveis. Esta propriedade é muito importante para o desenvolvimento de um produto natural, porém, sem a presença das células microbianas.

As bactérias naturalmente fazem parte dos diferentes estágios de desenvolvimento dos cogumelos, auxiliando na degradação do substrato, produzindo metabólitos importantes para a nutrição do cogumelo e auxiliando na indução da frutificação dos cogumelos. Conhecer a dinâmica, funcionalidade e a estrutura do microbioma dos cogumelos são ferramentas que auxiliam na melhoria dos métodos de cultivo e produção. O conhecimento de todas essas interações ecológicas é importante para a seleção de novos agentes de biocontrole de pragas e doenças no cultivo de cogumelos, com o potencial de substituir agrotóxicos extensivamente utilizados (Carrasco & Preston, 2019).

4. Conclusão

As duas cepas de *Bacillus* sp isoladas de cogumelos *A. bisporus* apresentaram atividade antifúngica sobre as quatro cepas de *L. fungicola*. A cepa de *Bacillus* sp. com maior porcentagem de inibição foi a M18. Além disso, observou-se também que duas cepas de *L. fungicola* apresentaram atividade de inibição sobre as duas cepas de *Bacillus* sp.

5. Referências

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446–475.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Berendsen, R. L., Baars, J. J. P., Kalkhove, S. I. C., Lugones, L. G., Wösten, H. A. B., & Bakker, P. A. H. M. (2010). *Lecanicillium fungicola*: Causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular Plant Pathology*, *11*(5), 585–595.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00627.x>
- Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, *47*(1), 9–17. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-1-9>
- Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, *12*(5), 639–649. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>
- Císarová, M., Tančinová, D., Medo, J., & Kačániová, M. (2016). The in vitro effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *51*(10), 668–674.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1191887>

- Donato, R., Sacco, C., Pini, G., & Bilia, A. R. (2020). Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 249, p. 112376). Elsevier Ireland Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112376>
- Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, 38(2), 109–112.
<https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- Geösel, A., Szabó, A., Akan, O., & Szarvas, J. (2014). *Effect of Essential Oils on Mycopathogens of Agaricus*. 530–535.
- Gogoi, P., Baruah, P., & Nath, S. C. (1997). Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* pers. *Journal of Essential Oil Research*, 9(2), 213–215.
<https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9699462>
- Hamzah, M. H., Che Man, H., Abidin, Z. Z., & Jamaludin, H. (2014). Comparison of citronella oil extraction methods from *Cymbopogon nardus* grass by ohmic-heated hydro-distillation, hydro-distillation, and steam distillation. *BioResources*, 9(1), 256–272. <https://doi.org/10.15376/biores.9.1.256-272>
- Horváth, G., Török Jenei, J., Vágvölgyi, C., Böszörményi, A., & Krisch, J. (2016). Effects of essential oil combinations on pathogenic yeasts and moulds. *Acta Biologica Hungarica*, 67(2), 205–214. <https://doi.org/10.1556/018.67.2016.2.8>
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6303–6307.
<https://doi.org/10.1021/jf060608c>
- Lee, L. T., Garcia, S. A., Martinazzo, A. P., & Teodoro, C. E. D. S. (2020). Fungitoxidade e composição química do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre o *Aspergillus flavus*. *Research, Society and Development*, 9(8), 202985628. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5628>
- Nakamura, M., Endo, E., de Sousa, J. P., Callejon, D., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho,

- B., de Freitas, O., Nakamura, C., & Lopes, N. (2016). Copaiba Oil and Its Constituent Copalic Acid as Chemotherapeutic Agents against Dermatophytes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(8), 1377–1383.
<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160309>
- Pandey, A. K., Rai, M. K., & Acharya, D. (2003). Chemical Composition and Antimycotic Activity of the Essential Oils of Corn Mint (*Mentha arvensis*) and Lemon Grass (*Cymbopogon flexuosus*) Against Human Pathogenic Fungi. *Pharmaceutical Biology*, 41(6), 421–425.
<https://doi.org/10.1076/phbi.41.6.421.17825>
- Pérez-García, A., Romero, D., & De Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 187-193.
- Santana Nunes, J., Rocha de Brito, M., Cunha Zied, D., Aparecida das Graças Leite, E., Souza Dias, E., & Alves, E. (2017). Evaluation of the infection process by *Lecanicillium fungicola* in *Agaricus bisporus* by scanning electron microscopy. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1), 36–42.
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.04.006>
- Santos, T. L. dos, Belan, L. L., Zied, D. C., Dias, E. S., Alves, E., Santos, T. L. dos, Belan, L. L., Zied, D. C., Dias, E. S., & Alves, E. (2017). Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. *Ciência Rural*, 47(5).
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160780>
- Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., & Kundu, B. (2017). 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*, 123(3), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>
- Si, L., Chen, Y., Han, X., Zhan, Z., Tian, S., Cui, Q., & Wang, Y. (2012). Chemical composition of essential oils of *Litsea cubeba* harvested from its distribution areas in China. *Molecules*, 17(6), 7057–7066.
<https://doi.org/10.3390/molecules17067057>

- Simic, A., Rančić, A., Sokovic, M. D., Ristic, M., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., & Marin, P. D. (2008). Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, *46*(6), 437–441. <https://doi.org/10.1080/13880200802055917>
- Sobrinho, G., Brito, N., Santos, A., & Novaes, Q. (2018). atividade antagonista de *Bacillus subtilis* sobre dois isolados de *Fusarium solani* do maracujazeiro, por diferentes métodos. *Enciclopédia Biosfera*, *15*(28).
DOI:10.18677/EnciBio_2018B12
- Thielmann, J., & Muranyi, P. (2019). Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene . *Journal of Essential Oil Research*, *31*(5), 361–378.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1611671>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*, *1*, 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yamaguchi, M. U., Garcia, F. P., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., & Nakamura, C. V. (2011). Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *99*(3), 507–514.
<https://doi.org/10.1007/s10482-010-9516-3>
- Zied, D. C., Nunes, J. S., Nicolini, V. F., Gimenez, A. P., Rinker, D. L., & Dias, E. S. (2015). Tolerance to *Lecanicillium fungicola* and yield of *Agaricus bisporus* strains used in Brazil. *Scientia Horticulturae*, *190*, 117–122.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.04.021>

Artigo Científico

Artigo 3: Efeito inibitório de DMSO, Tween 80 e Triton X-100 sobre *Agaricus bisporus* e *Lecanicillium fungicola*

Artigo científico submetido para o periódico: **Brazilian Journal of Microbiology**

Resumo

Os surfactantes são substâncias muito utilizadas no preparo de suspensões de esporos, em especial, de fungos ascomicetos. Dentre esses estudos, estão aqueles que avaliam o uso de compostos antifúngicos. Entretanto, esses compostos, além de bons dispersantes, podem apresentar também um efeito inibitório sinérgico ou adicional ao efeito dos antifúngicos testados sobre a germinação dos esporos ou sobre o crescimento micelial. Por isso, é vital que se avalie esse tipo de efeito antes da sua utilização neste tipo de ensaio. O fungo *Lecanicillium fungicola* é o agente causador da doença da bolha seca, que acomete o cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus*. Além do preparo da suspensão de esporos, os surfactantes são utilizados na solubilização ou preparo de emulsões de óleos essenciais testados no controle de *L. fungicola*. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do DMSO (solvente e surfactante fraco) e dois surfactantes (Tween 80 e Triton X-100) nas concentrações de 0,5 e 1%, sobre o crescimento micelial de *L. fungicola* e *A. bisporus*. Para DMSO, não se observou alterações visuais nas colônias para as duas espécies. Tween 80 afetou o crescimento micelial, fazendo com que as colônias crescessem menos, quando comparadas com o controle, além de alterar o aspecto da colônia para ambas as espécies. Triton X-100 apresentou efeito inibitório ainda maior sobre o crescimento das duas espécies fúngicas, afetando consideravelmente tanto o tamanho como a morfologia da colônia. Análises de microscopia eletrônica de varredura permitiram observar que os surfactantes alteraram as estruturas e os aspectos das hifas de ambos os fungos e no caso do *L. fungicola* também afetam a quantidade e aspecto dos esporos.

Palavras-chaves: DMSO, Triton x-100, Tween 80, doença da bolha seca, champignon, MEV.

Abstract

Surfactants are substances widely used in the preparation of suspensions of spores, especially of ascomycete fungi. Among these studies are those that evaluate the use of antifungal compounds. However, these compounds, in addition to being good dispersants, may also have a synergistic or additional inhibitory effect to the action of the tested antifungals on spore germination or mycelial growth. Therefore, it is vital to evaluate this type of effect before its use in this type of test. The fungus *Lecanicillium fungicola* is the causative agent of dry bubble disease, which affects the cultivation of the button mushrooms (*Agaricus bisporus*). In addition to preparing the spore suspension, surfactants are used in the solubilization or preparation of essential oil emulsions tested in the control of *L. fungicola*. The aim of this study was to evaluate the influence DMSO (solvent and a weak surfactant) and two surfactants: (Tween 80 and Triton X-100) at the concentrations of 0.5 and 1%, on the mycelial growth of *L. fungicola* and *A. bisporus*. For DMSO, no visual changes were observed in the colonies for both species. Tween 80 affected mycelial growth, causing colonies to grow less when compared to control, in addition to changing the morphology of the colony for both species. Triton X-100 showed an even greater inhibitory effect on the growth of the two fungal species, considerably affecting both the size and the morphology of the colony. Scanning electron microscopy analysis showed that surfactants alter the structures and aspects of the hyphae of both fungi and in the case of *L. fungicola* they also affect the quantity and aspect of the spores.

Key-words: DMSO, Triton x-100, Tween 80, dry bubble disease, button mushroom

1. Introdução

Um dos maiores problemas econômicos no cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus* no Brasil é a doença da bolha seca, causada pelo fungo *L. fungicola*¹, cujos sintomas são a formação de massas de tecidos indiferenciados nos cogumelos, comprometendo a sua qualidade^{2,3}. Dentro dessa problemática, tem se buscado alternativas para o controle deste e de outros patógenos no cultivo de cogumelos no Brasil. Neste contexto, o uso dos óleos essenciais tem-se mostrado uma alternativa promissora, entretanto, ainda são necessários estudos para entender a interação patógeno-hospedeiro. Para isto, os ensaios com os óleos essenciais requerem a utilização de surfactantes, os quais permitem o preparo de emulsões com as concentrações desejadas de cada tipo de óleo essencial⁴⁻⁶.

Os surfactantes são moléculas com capacidade para reduzir a tensão superficial entre diferentes tipos de líquidos ou entre líquidos e sólidos⁷. Surfactantes são compostos caracterizados por duas regiões, sendo uma de natureza polar (hidrofílica) e, outra, de natureza apolar (hidrofóbica). Esta característica torna os surfactantes substâncias anfipáticas, ou seja, possuem a capacidade de interagir em meios com polaridades diferentes^{8,9}. Por isso, os surfactantes são utilizados para homogeneizar soluções com características distintas, como em mistura de soluções aquosas e oleosas.

Devido as suas características, os surfactantes são muito utilizados no preparo de suspensões de conídios. Tanto esporos como hifas aéreas são conhecidos por apresentarem uma superfície hidrofóbica, conferida por proteínas hidrofobinas^{10,11}. Essa característica dificulta a dispersão dos conídios ou outros tipos de esporos em suspensões aquosas, requerendo, por isso, a utilização dos surfactantes. Entretanto, um problema que deve ser considerado é o efeito inibitório que os surfactantes podem apresentar sobre a germinação, o que pode ser influenciado tanto pelo tipo como pela concentração do surfactante utilizado^{12,13}. Na verdade, a ação antimicrobiana dos surfactantes já é bem documentada⁸ e, por isso, deve-se sempre levar em conta o seu possível efeito inibitório sobre as espécies fúngicas em estudo. Neste contexto, o efeito do surfactante pode ocorrer em dois momentos distintos. No primeiro momento, o efeito inibitório ocorre diretamente quando o mesmo é utilizado para o preparo da suspensão de

conídios do patógeno, podendo afetar, portanto, a sua viabilidade. No segundo momento, o efeito inibitório pode ocorrer de forma sinérgica ou adicional, quando utilizado para o preparo da emulsão do óleo essencial utilizado nos ensaios para o controle do patógeno. Portanto, é importante conhecer o efeito do surfactante sobre a germinação dos conídios ou sobre o crescimento micelial do patógeno, para evitar que os resultados de inibição do surfactante sejam confundidos com a ação inibitória do agente de controle propriamente, neste caso, o óleo essencial.

Tween 80 é um emulsificante não iônico amplamente utilizado em produtos cosméticos, farmacêuticos e alimentos ¹⁴. É frequentemente incluído em experimentos de laboratório, especialmente em combinação com solução salina para o preparo de suspensões de conídios e endósporos bacterianos ¹³.

Triton X-100 é um detergente não iônico, sendo um dos agentes mais utilizados para solubilizar biomembranas. Este detergente interage com a membrana e a camada lipídica, desencadeando a permeabilização e quebra de tensão da mesma ¹⁵. O Triton X-100 é um detergente relativamente suave quando comparado com outros surfactantes. Pelo fato de não ser um detergente desnaturante, pode ser utilizado em várias metodologias para extração de ácidos nucleicos, proteínas e organelas. Entretanto, o fato de ser utilizado para lisar células ou permeabilizar membranas ¹⁶, significa também que, quando utilizado na composição da suspensão de esporos, o Triton X-100 pode também ter um efeito adverso.

O DMSO (Dimethyl Sulfoxide) é um composto orgânico com propriedades solventes, além de ser considerado um surfactante fraco, utilizado como crioprotetor em suspensões de esporos de fungos. O DMSO é usado também no preparo de soluções de drogas utilizadas nos ensaios de controle de fungos dermatófitos. Esses estudos permitiram observar que o DMSO pode apresentar um efeito sinérgico com as drogas testadas contra os fungos, em baixas concentrações, ou até mesmo um efeito inibitório acentuado quando utilizado na concentração de 10% ¹⁷. Trata-se de um composto que penetra facilmente nas membranas celulares, pele e mucosa. Por isso, pode atuar como um intensificador de penetração e aumentar a penetração transmembranar de antifúngicos e outros compostos ¹⁸. Como um solvente, o DMSO pode ser utilizado também na aplicação de óleos essenciais como antifúngicos. Entretanto, considerando que este

produto apresenta ação antifúngica contra dermatófitos, além de bactérias^{17,18}, é muito importante avaliar o seu efeito também sobre *L. fungicola* e *A. bisporus*.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito destas substâncias sobre o crescimento micelial dos fungos *L. fungicola* e *A. bisporus*, além das possíveis ações sinérgicas destes com os óleos essenciais.

2. Metodologia

2.1 Microrganismos utilizados

Os isolados de *L. fungicola* e *A. bisporus* foram obtidos, conforme descrito por Lee et al. (2020). Três isolados de *L. fungicola* foram utilizados (LF-LTL01, LF-LTL02 e LF-LTL03), obtidos de regiões de cultivo diferentes. Duas cepas de *A. bisporus* foram utilizadas, sendo da variedade Champignon (ABI-LTL-01 e ABI-LTL02) e outra da variedade Portobello (PB-LTL01), oriundas de cultivo na cidade de Oliveira – Minas Gerais, Brasil.

2.2 Avaliação do efeito dos surfactantes no crescimento micelial dos fungos

L. fungicola e *A. bisporus* foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA por 10 dias a $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e, quando necessário, as culturas foram mantidas em refrigerador a 4°C . Avaliou-se o crescimento micelial das duas espécies em BDA com DMSO (dimetilsulfóxido) e os surfactantes Tween 80, e Triton X-100, nas concentrações de 0,5 e 1%. Cada surfactante foi adicionado ao meio BDA nas suas respectivas concentrações e autoclavados a 121°C por 20 minutos. Como controle, foram utilizadas placas que continham apenas meio BDA. A inoculação foi efetuada com palitos de madeira estéreis por meio de simples picada, transferindo-se esporos e fragmentos de micélio para o ponto central das placas. Após inoculação, as placas foram incubadas em câmara B.O.D a $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 10 dias, no escuro. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada com um paquímetro digital, fazendo-se duas medidas do diâmetro das colônias a cada 48 horas, com os dois eixos cruzando-se a 90° e previamente marcados na face externa do fundo da placa de Petri. O

diâmetro da colônia de cada tratamento teste foi comparado com a dimensão dos controles. A porcentagem de inibição (PI) do crescimento micelial causada pelo surfactante foi calculada conforme Billerbeck et al. (2001): **PI: $(A-B/A) \times 100$** , sendo: A = diâmetro médio da colônia no controle; B = diâmetro médio da colônia no tratamento.

2.4 Análise da ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a obtenção das amostras, foram utilizadas culturas fúngicas crescidas em meio com os surfactantes a 0,5%. As amostras consistiram em discos miceliais (7 mm), os quais foram imersos em solução fixadora (Karnovsky's modificado) pH 7,2 e armazenados a 4°C por 24h. Após este período, seguiu-se o protocolo descrito por Bozzola e Russell (1999), com algumas modificações. As amostras foram lavadas por três vezes em água destilada e em seguida desidratadas em gradiente crescente de acetona (25, 50, 75, 90%), por 10 minutos cada etapa e 100% (por três vezes no mesmo tempo). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico Bal-Tec (Balzers, Liechtenstein) modelo CPD 030, para substituição da acetona por CO₂. Para completar a secagem, os espécimes obtidos foram montados em *stubs* (suportes de alumínio, cobertos com uma camada de papel alumínio e fixados com fita dupla face de carbono) e cobertos com ouro em evaporador Bal-Tec (Balzers, Liechtenstein) modelo SCD 050, para observação em microscópio eletrônico de varredura, modelo Evo® 40 VP (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.5 Análise estatística

As variáveis obtidas nos testes foram analisadas por meio do programa estatístico SISVAR®, com análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

3. Resultados e discussão

3.1 Influência dos surfactantes no crescimento micelial de *Lecanicillium fungicola*

Houve efeito significativo dos compostos testados, para o tempo de incubação, assim como para a interação (surfactante x tempo), indicando que o crescimento de *L. fungicola* na presença dos surfactantes depende da interação entre a concentração aplicada e o tempo de incubação do fungo.

Para os três isolados de *L. fungicola*, DMSO e Tween 80, ambos a 1%, permitiram crescimento micelial idêntico ao controle, enquanto que, na presença de Triton X-100, o crescimento micelial de todos os isolados foi intensamente inibido (Tabela 1; Figura 1A). Portanto, Triton X-100 não deve ser usado para o preparo de suspensões de esporos de *L. fungicola*. É importante destacar que, para DMSO e Tween 80, observou-se um crescimento micelial menor quando utilizou-se a concentração de 0,5%. Para Triton X-100 não se observou o mesmo efeito, uma vez que as diferenças entre as duas concentrações não foram significativas. Esses resultados podem indicar, portanto, um efeito de estímulo do crescimento na concentração de 1%, entretanto, é algo difícil de explicar, o que requer a confirmação dos resultados. Além do crescimento micelial, observou-se uma alteração na morfologia da colônia de *L. fungicola* na presença de Tween 80 0,5% (Figura 1D). Efeito semelhante foi observado por Hamzah et al. (2018) sobre *Aspergillus brasiliensis*, porém, com Triton X-100. Este é, portanto, um importante aspecto que merece ser melhor estudado.

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto considerado simples, mas considerado adequado para solubilizar agentes terapêuticos ou outros que não são solúveis em água pura. Além disso, o DMSO apresenta características consideradas particularmente importantes como penetração rápida e, conseqüentemente, maior penetração de outras substâncias nas membranas biológicas; eliminação de radicais livres; efeitos na coagulação; etc. A toxicidade sistêmica do DMSO é considerada baixa. Combinações de DMSO com outros agentes tóxicos provavelmente constituem seu maior potencial tóxico²². Além de ser um solvente importante, o DMSO também apresenta propriedades terapêuticas e é amplamente utilizado para tratar injúrias, desde manifestações cutâneas a infecções como as do trato urinário²³.

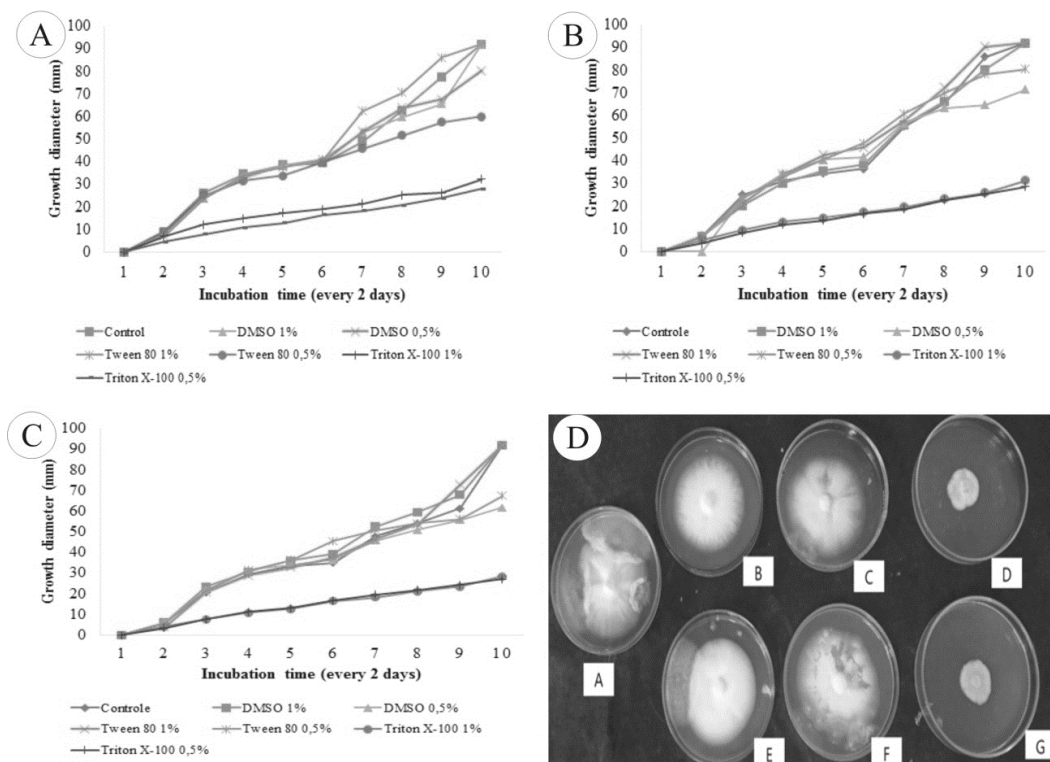


Figura 1. Crescimento micelial de *L. fungicola*, cepas: A) (LF-LTL01); B) L (LF-LTL02) e C) (LF-LTL03) sobre a influência de diferentes surfactantes e solvente. D) Fotografia de placas mostrando a influência dos surfactantes em diferentes concentrações no crescimento micelial do fungo *L. fungicola*. (A: Controle; B: DMSO 1%; C: Tween 80 1%; D: Triton X-100 1%; E: DMSO 0,5%; F: Tween 80 0,5% e G: Triton X-100 0,5%).

Tabela 1. Crescimento micelial (mm) das diferentes cepas de *L. fungicola* sob diferentes concentrações dos surfactantes e solvente testados após 10 dias de avaliação.

Cepas	Controle	DMSO 0,5%	DMSO 1%	Tween 80 0,5%	Tween 80 1%	Triton X-100 0,5%	Triton X-100 1%
LF-LTL01	92Aa	80,2Bb	92Aa	59,9Dc	92Aa	32,3Ed	28Ed
LF-LTL02	92Aa	71,5Cc	92Aa	80,5Bb	92Aa	28,7Ed	31,2Ed
LF-LTL03	92Aa	61,7Db	92Aa	67,3Cb	92Aa	26,9Ec	28,3Ec

CV: 4,91%

*Letras iguais maiúsculas nas colunas demonstra serem estatisticamente semelhantes entre as diferentes cepas. Letras minúsculas nas linhas demonstra serem estatisticamente iguais a cepa sob diferentes surfactantes (Scott-Knott 5%)

No estudo desenvolvido por Reese e Maguire (1969), utilizando surfactantes como estimulantes de produção de enzimas, todos os diferentes sistemas enzimáticos responderam de forma favorável ao Tween 80. Segundo os autores, o surfactante altera a permeabilidade da célula, indicando que eles promovem a entrada e saída de compostos. Animais, anfíbios e larvas apresentam maior resposta ao composto ativo na presença de surfactantes. Além disso, os surfactantes podem também alterar as características fenotípicas dos fungos. Tween 80 foi associado a um aumento da biomassa fúngica e de atividade enzimática em *Penicillium simplicissimum*. Entretanto, o efeito sobre o crescimento ou metabolismo do fungo pode variar de acordo com o tipo de surfactante. Garon et al. (2002), por exemplo, observaram que o Triton X-100 foi mais tóxico que o Tween 80, apesar de ambos serem utilizados para fungos. Segundo os autores a baixa tolerância ao surfactante pode estar relacionada às interações físico-químicas entre as estruturas fúngicas, tais como membrana plasmática e parede celular, com o surfactante. Porém, esse tipo de efeito varia não apenas de um surfactante para outro, mas também de espécie para espécie, sendo que, às vezes, as variações ocorrem dentro do mesmo gênero. Em outro estudo observou-se um crescimento superior de *Lecanicillium lecanii* na presença de Triton X-100, quando comparado com o crescimento na presença de Tween 80¹⁹. Para o presente trabalho, com *Lecanicillium fungicola*, Triton X-100 apresentou o maior efeito inibitório sobre o crescimento fúngico, com um diâmetro de colônia inferior a 50% quando comparado com o controle. Esses resultados corroboram, portanto, a assertiva anterior de que efeito do surfactante depende muito da espécie de fungo estudada, o que tem sido demonstrado também em outros estudos, inclusive para o Tween 80¹⁴. Isto torna necessário fazer novos ensaios sempre que se trabalha com novas espécies de fungos ou com novos surfactantes.

Amostras de *L. fungicola* cultivadas em meio com surfactante na concentração de 0,5% foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura (Figura 2). As imagens obtidas mostram as diferenças causadas pelos surfactantes na morfologia das hifas de *L. fungicola*, quando comparadas ao controle. De modo geral, observa-se no controle hifas mais homogêneas, com textura lisa e diâmetro uniforme, enquanto que, nos tratamentos com surfactantes, observa-se hifas deformadas, com rugosidade, mais emaranhadas e organizadas de forma mais indefinida.

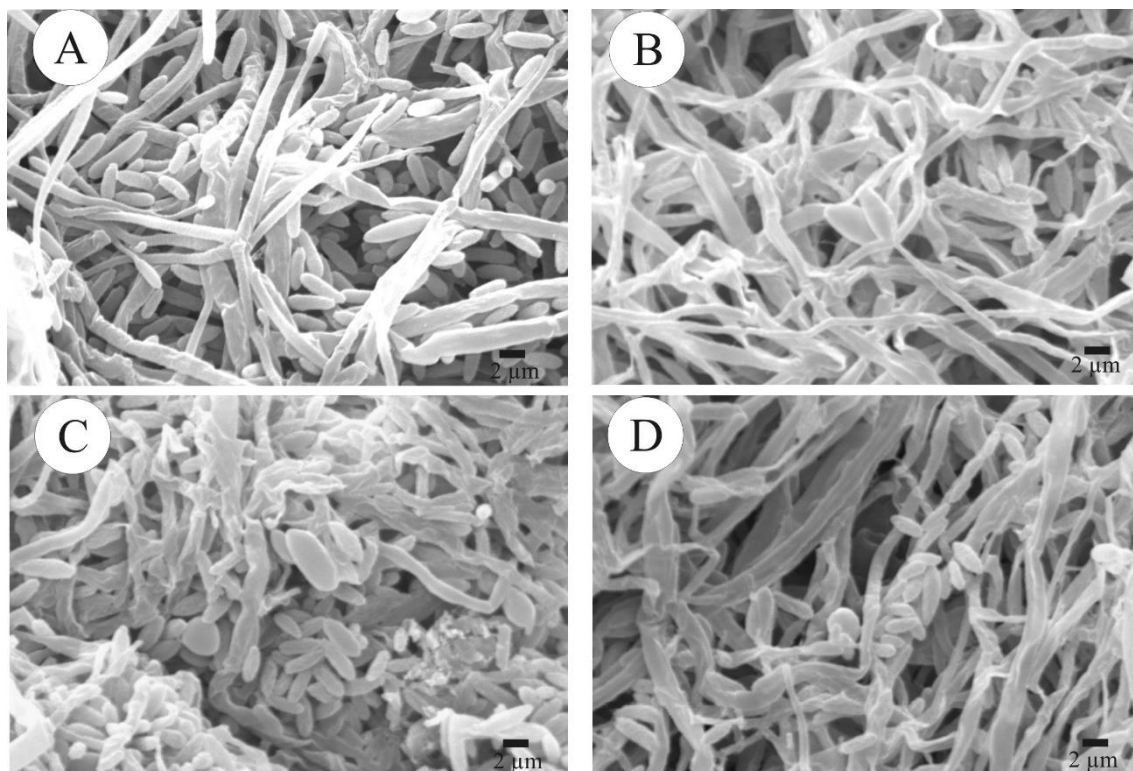


Figura 2. Eletromicrografias de varredura das hifas de *L. fungicola* após cultivo na presença dos surfactantes. A: Controle, B: Tween 80, C: DMSO e D: Triton X-100.

3.3 Efeito dos surfactantes sobre o crescimento micelial de *Agaricus bisporus*

Os surfactantes apresentaram um efeito mais acentuado sobre *A. bisporus*, em comparação a *L. fungicola* (Tabela 2, Figura 3). O aspecto mais importante foi que, além do Triton X-100, o qual inibiu completamente o crescimento do fungo, observou-se também que Tween 80 apresentou um forte efeito inibitório, reduzindo em mais de 50% o diâmetro da colônia. Portanto, o único composto que permitiu um crescimento micelial próximo ao controle foi o DMSO. O segundo aspecto importante observado foi que não houve diferença significativa entre as concentrações dos surfactantes, inclusive DMSO. E, por fim, também não se observou diferenças significativas entre as cepas de *A. bisporus*, ao contrário do que se observou para *L. fungicola*.

Com base no exposto acima, pode-se dizer que, para os experimentos com *A. bisporus*, dentre os surfactantes testados, o único que pode ser utilizado para o preparo das emulsões de óleos essenciais é o DMSO, uma vez que os demais apresentaram efeito inibitório evidente sobre o fungo. Estes resultados são extremamente importantes para este tipo de ensaio, uma vez que o interesse foi avaliar o efeito inibitório dos óleos

essenciais sobre o patógeno *L. fungicola*. Para isto, é vital que nem o óleo essencial e nem o surfactante utilizado para o seu preparo, apresentem qualquer efeito negativo sobre o cogumelo cultivado. Além disso, considerando que, posteriormente aos testes “*in vitro*”, serão realizados os testes “*in vivo*”, na presença do cogumelo, é importante também que o surfactante ou solvente não apresentem efeito inibitório sobre o fungo. Para uma aplicação prática, isto é também de suma importância, uma vez que o produto seria aplicado sobre a camada de cobertura, a qual deve ser completamente colonizada pelo micélio do cogumelo antes de iniciar a frutificação do mesmo.

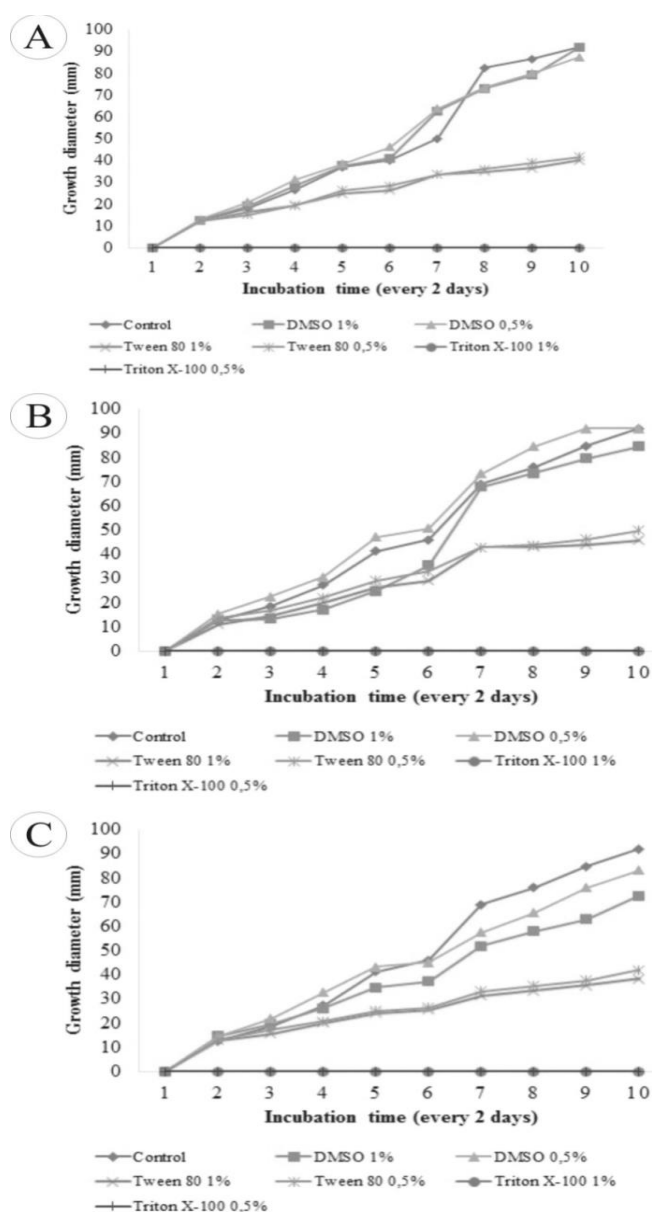


Figura 3. Efeito dos diferentes surfactantes sobre o crescimento micelial de *A. bisporus*: A) ABI-LTL01; B) ABI-LTL02 e C) PB-LTL01.

Tabela 2. Crescimento micelial (mm) das diferentes cepas de *Agaricus bisporus* sob diferentes concentrações dos surfactantes e solvente testados, após 10 dias de incubação.

Cepa	Controle	DMSO 0,5%	DMSO 1%	Tween 80 0,5%	Tween 80 1%	Triton X-100 0,5%	Triton X-100 1%
ABI- LTL01	92Aa	92Aa	87,4Ba	40Eb	41,7Eb	0Fc	0Fc
ABI- LTL02	92Aa	84,5Bb	92Aa	43,7Ed	49,7Dc	0Fe	0Fe
PB- LTL01	92Aa	72Cc	83,2Ba	38,3Ed	41,9Ed	0Fe	0Fe
CV: 5,82%							

*Letras iguais maiúsculas nas colunas demonstra serem estatisticamente semelhantes entre as diferentes cepas. Letras minúsculas nas linhas demonstra serem estatisticamente iguais a cepa sob diferentes surfactantes (Scott-Knott 5%).

Além do menor crescimento micelial observado na presença do surfactante Tween 80, verificou-se uma alteração intensa da morfologia de colônia de *A. bisporus* (Figura 4). Na verdade, este efeito foi muito mais acentuado em *A. bisporus* do que aquele observado em *L. fungicola*. A colônia de *A. bisporus* passou do aspecto cotonoso, típico dos fungos filamentosos, para um aspecto cremoso. Este efeito foi observado para as duas concentrações testadas de Tween 80. Para o Triton X-100, observou-se uma ação fungitóxica, impedindo completamente o desenvolvimento das colônias. Para o DMSO, o crescimento das colônias foi aparentemente normal, não se percebendo nenhuma alteração a olho nu. Entretanto, as análises de microscopia eletrônica mostraram uma alteração na morfologia e organização das hifas (Figura 5), demonstrando que o surfactante afeta algum aspecto da fisiologia do fungo, apesar de isso não ser visível a olho nu. É interessante notar que, na presença de Tween 80, as hifas apresentaram morfologia parecida com as hifas do controle, mas, por outro lado, a morfologia da colônia foi afetada de forma drástica. Esses resultados são uma evidência de que os surfactantes afetam aspectos diferentes da fisiologia do fungo. Portanto, a escolha do surfactante deve levar em conta não apenas a velocidade de crescimento micelial e a morfologia da colônia. Dependendo dos objetivos do estudo, mesmo que estes parâmetros não sejam afetados pelo surfactante, o surfactante pode ainda não ser o mais apropriado.

Portanto, para a escolha do surfactante ideal, deve-se avaliar o seu efeito sobre parâmetros específicos de acordo com os objetivos do estudo a ser feito.

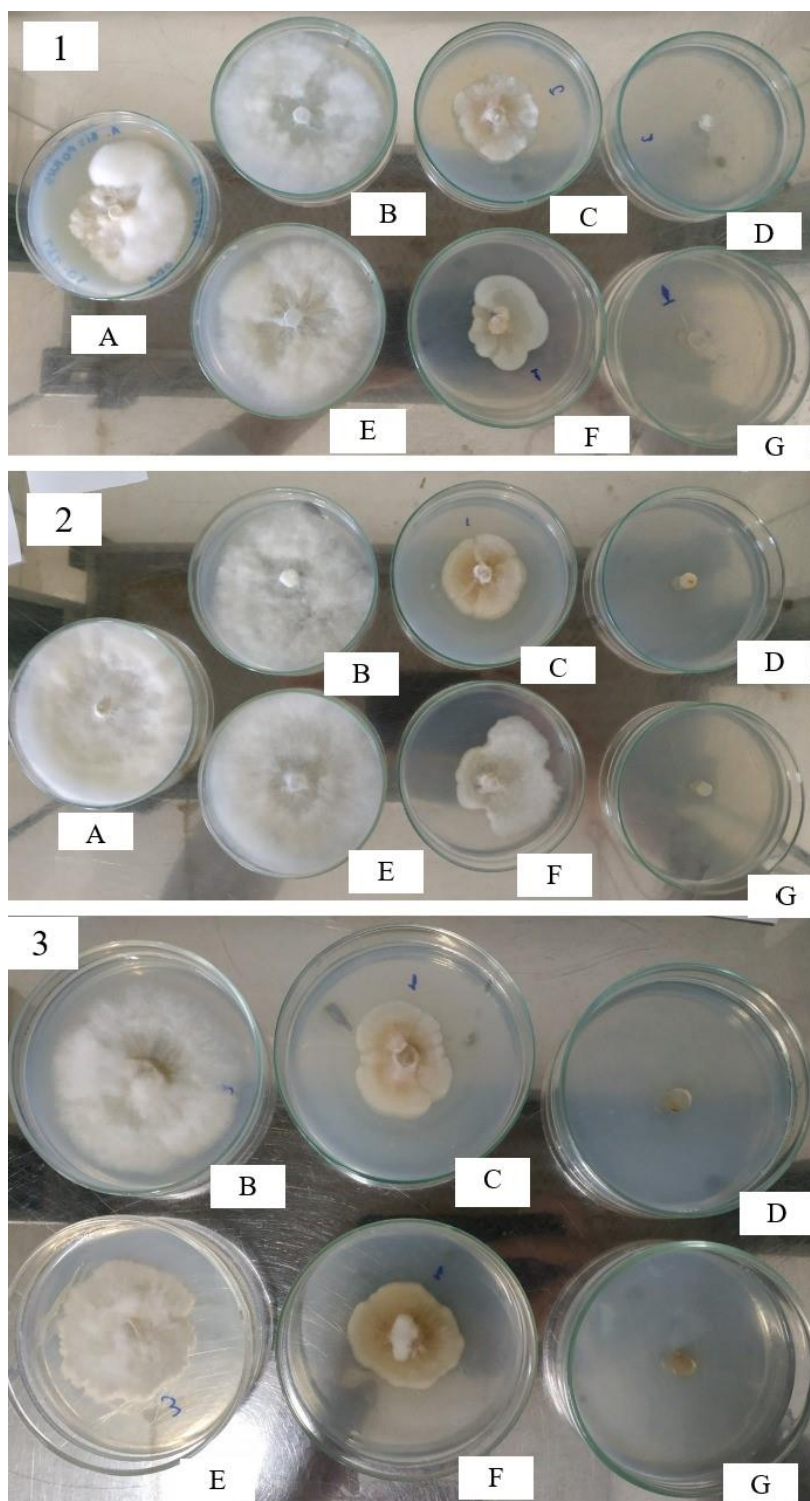


Figura 4. Morfologia de colônias de *A. bisporus* cultivadas na presença de diferentes surfactantes e solvente. (1: ABI-LTL01; 2: ABI-LTL02 e 3: PB-LTL01 onde se lê A: controle; B: DMSO 1%; C: Tween 80 1%; D: Triton X-100 1%; E: DMSO 0,5%; F: Tween 80 0,5% e G: Triton X-100 0,5%).

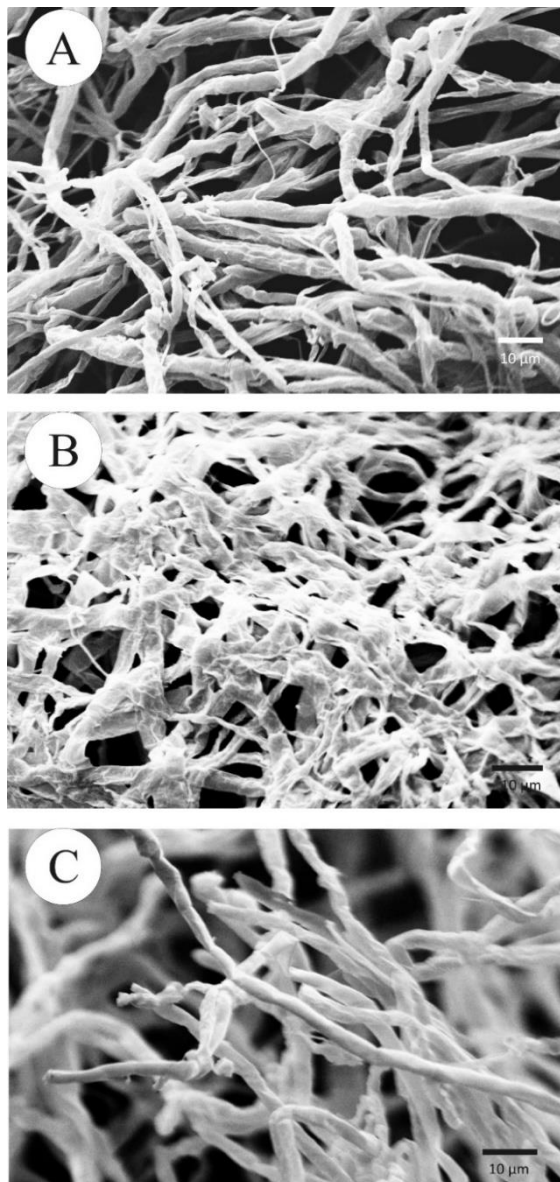


Figura 2. Eletromicrografia das hifas de *Agaricus bisporus* ABI-LTL01 após cultivo na presença dos surfactantes e solvente. A: controle, B: DMSO 0,5% e C: Tween 80 0,5%.

4. Conclusão

Para os estudos *in vitro*, DMSO e Tween 80, ambos a 1%, são adequados para o preparo de suspensões de esporos de *L. fungicola*. Mas, para o preparo de emulsões de óleos essenciais visando o controle de *L. fungicola* durante o cultivo de *A. bisporus*, nenhum desses surfactantes é indicado. Neste caso, deve-se usar DMSO 1%, tanto para o preparo das emulsões de óleos essenciais, como para o preparo das suspensões de conídios de *L. fungicola* a serem utilizadas nos estudos *in vivo* com *A. bisporus*.

5. Referências:

1. Berendsen RL, Kalkhove SIC, Lugones LG, Baars JJP, Wösten HAB, Bakker PAHM. Effects of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from mushroom cultures on *Lecanicillium fungicola*. *Biol Control*. 2012;63(2):210-221. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.07.012
2. Largeteau ML, Savoie JM. Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: Biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;86(1):63-73. doi:10.1007/s00253-010-2445-2
3. Rokni N, Goltapeh EM. Tolerance to dry bubble disease (*Lecanicillium fungicola*) in Iranian wild germplasm of button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Mycoscience*. 2019;60(2):125-131. doi:10.1016/j.myc.2018.10.001
4. Regnier T, Combrinck S. In vitro and in vivo screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. *South African J Bot*. 2010;76(4):681-685. doi:10.1016/j.sajb.2010.07.018
5. Diáñez F, Santos M, Parra C, Navarro MJ, Blanco R, Gea FJ. Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. *Lett Appl Microbiol*. 2018;67(4):400-410. doi:10.1111/lam.13053
6. Lee LT, Costa LMAS, Moraes TSJ de, et al. Screening de óleos essenciais contra *Lecanicillium fungicola*. *Res Soc Dev*. 2020;9(9):e269997098. doi:10.33448/rsd-v9i9.7098
7. Manikantan H, Squires TM. Surfactant dynamics : hidden variables controlling fluid flows. *J Fluid Mech*. 2020;892:1-115. doi:https://doi.org/10.1017/jfm.2020.170
8. Da Silva JDF, Da Silva YP, Piatnicki CMS, Böckel WJ, Mendonça CRB. Microemulsões: Componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. *Quim Nova*. 2015;38(9):1196-1206. doi:10.5935/0100-4042.20150135
9. Nakama Y. Surfactants. In: *Cosmetic Science and Technology: Theoretical*

- Principles and Applications*. Elsevier Inc.; 2017:231-244. doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X
10. Ball SR, Kwan AH, Sunde M. Hydrophobin rodlets on the fungal cell wall. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol 425. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020:29-51. doi:10.1007/82_2019_186
 11. Deacon JW. *Fungal Biology*. Wiley; 2013. Accessed July 25, 2018. <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=SpwA7XdVBsEC&oi=fnd&pg=PT11&dq=deacon+fungal+biology&ots=3cN6C7RWo4&sig=bnSlh8XCzgSDcaaUdq4cHXxKTMw#v=onepage&q=deacon+fungal+biology&f=false>
 12. Hari M, Joseph SA, Mathew S, Nithyaja B, Nampoori VPN, Radhakrishnan P. Thermal diffusivity of nanofluids composed of rod-shaped silver nanoparticles. *Int J Therm Sci*. 2013;64:188-194. doi:10.1016/j.ijthermalsci.2012.08.011
 13. Mwamburi LA, Laing MD, Miller RM. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of beauveria bassiana. *Brazilian J Microbiol*. 2015;46(1):67-74. doi:10.1590/S1517-838246120131077
 14. Nielsen CK, Kjems J, Mygind T, Snabe T, Meyer RL. Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. *Front Microbiol*. 2016;7(NOV):1878. doi:10.3389/fmicb.2016.01878
 15. Mattei B, Lira RB, Perez KR, Riske KA. Membrane permeabilization induced by Triton X-100: The role of membrane phase state and edge tension. *Chem Phys Lipids*. 2017;202:28-37. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.11.009
 16. Koley D, Bard AJ. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16783-16787. doi:10.1073/pnas.1011614107
 17. Randhawa MA. The Effect of Dimethyl Sulfoxide DMSO on the Growth of Dermatophytes. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006;47:313-318. doi:<https://doi.org/10.3314/jjmm.47.313>
 18. Papich MG. Dimethyl Sulfoxide (DMSO). In: *Saunders Handbook of Veterinary*

- Drugs*. Elsevier; 2016:248-249. doi:10.1016/B978-0-323-24485-5.00215-1
19. de Billerbeck VG, Roques CG, Bessière JM, Fonvieille JL, Dargent R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol*. 2001;47(1):9-17. doi:10.1139/cjm-47-1-9
 20. Bozzola JJ, Russell LD. *Electron Microscopy : Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett; 1999. Accessed August 19, 2018. https://books.google.com.br/books/about/Electron_Microscopy.html?id=zMkBA PACbEkC&redir_esc=y
 21. Hamzah N, Singhal N, Padhye L, Swift S. Effect of surfactants on *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 physicochemical properties. *J Environ Chem Eng*. 2018;6(2):3392-3398. doi:10.1016/j.jece.2018.04.068
 22. Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet*. 1986;76(1):61-90.
 23. Swanson BN. Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharmacol*. 1985;5(1-2):1-33.
 24. Reese ET, Maguire A. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl Microbiol*. 1969;17(2):242-245.
 25. Zeng GM, Shi JG, Yuan XZ, et al. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. *Enzyme Microb Technol*. 2006;39(7):1451-1456. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.03.035
 26. Garon D, Krivobok S, Wouessidjewe D, Seigle-Murandi F. Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*. 2002;47(3):303-309. doi:10.1016/S0045-6535(01)00299-5
 27. Gams W, Zare R. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification^o. *Nov Hedwigia*. 2001;72(3-4):329-337. doi:10.1127/nova.hedwigia/72/2001/329

Artigo 4: Essential oils as an alternative to control *Lecanicillium fungicola* in the cultivation of champignon mushrooms

Artigo científico submetido para o periódico: **Industrial Crops and Products**

Resumo

Lecanicillium fungicola é o agente causal da doença da bolha seca no cogumelo champignon, bem como de outros cogumelos cultivados comercialmente. Portanto, um melhor entendimento de novos e eficazes métodos de controle desse fungo é necessário para minimizar o uso de produtos químicos na indústria de cogumelos. Os óleos essenciais (OE) foram relatados como produtos naturais antifúngicos promissores. No presente estudo, óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eugenia caryophyllus* (cravo folha) e *Litsea cubeba* (pimenta chinesa) foram avaliados *in vitro* e *in vivo* para o controle de três linhagens de *L. fungicola*. var. *fungicola*, bem como o efeito sinérgico desses OE contra cepas de *L. fungicola*. O efeito dos OE na morfologia de *L. fungicola* foi estudado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os OE foram caracterizados pela presença de citronelal (35,57%), eugenol (88,90%) e geraniol (42,25%) respectivamente. Todos os OE apresentaram 100% de inibição do crescimento micelial de *L. fungicola* nas concentrações de 1%. *Litsea cubeba* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) em concentrações mais baixas ($\geq 0,0156\%$). Com base nos resultados das concentrações fungicidas mínimas (CFM $\geq 0,0312\%$), o efeito inibitório dos OE foi mais eficiente em *Litsea cubeba*. Um efeito sinérgico foi observado a partir da combinação dos OE de *L. cubeba* com *C. winterianus* e *E. caryophyllus* com *L. cubeba* em uma concentração muito menor. A análise de MEV revelou aspecto de aspereza de hifas e esporos em amostras tratadas com OE. No teste *in vivo* os OE se mostraram eficientes no controle da incidência da doença da bolha seca sem prejudicar a produção de *A. bisporus*. Assim, o efeito antimicrobiano sinérgico e a eficácia observados neste estudo abrem novas perspectivas sobre o desenvolvimento de uma nova mistura antifúngica natural e potente contra *L. fungicola* na indústria de cogumelos.

Palavras-chaves: *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus*, *Litsea cubeba*, Atividade sinérgica, CIM, MEV, *Agaricus bisporus*.

Abstract

Lecanicillium fungicola is the causative agent of dry bubble disease in button mushroom, as well as other commercially grown mushrooms. Therefore, a better understanding of new and effective methods of controlling this fungus is necessary to minimize the use of chemicals in the mushroom industry. Essential oils (EO) have been reported as promising natural antifungal products. In the present study, EO of *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eugenia caryophyllus* (clove leaf) and *Litsea cubeba* (Chinese pepper) were evaluated *in vitro* and *in vivo* to control three strains of *L. fungicola* var. *fungicola*, as well as the synergistic effect of these EO against strains of *L. fungicola*. The effect of EO on the morphology of *L. fungicola* was studied by scanning electron microscopy (SEM). EO were characterized by the presence of citronellal (35.57%), eugenol (88.90%) and geranial (42.25%) respectively. All EO showed 100% inhibition in the mycelial growth of *L. fungicola* at concentrations of 1% and 0.1%. *Litsea cubeba* showed minimum inhibitory concentration (MIC) at lower concentrations ($\geq 0.0156\%$). Based on the results of the minimum fungicidal concentrations (MFC $\geq 0.0312\%$), the inhibitory effect of EO was more efficient in *Litsea cubeba*. A synergistic effect was observed from the combination of the *L. Cubeba* EO with *C. winterianus* and *E. caryophyllus* with *L. cubeba* in a much lower concentration. The observation of SEM revealed an aspect of roughness of hyphae and spores in samples treated with EO. In the *in vivo* test, EO were efficient in controlling the incidence of dry bubble disease without impairing the production of *A. bisporus*. Thus, the synergistic antimicrobial effect and effectiveness observed in this study open new perspectives on the development of a new natural and potent antifungal mixture against *L. fungicola* in the production of mushrooms.

Keywords: *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus*, *Litsea cubeba*, Synergistic activity, MIC, SEM, *Agaricus bisporus*.

1. Introduction

The fungus *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare and Gams [synonym: *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk] (Zare and Gams, 2008), is the causal agent of dry bubble disease of the white button mushroom *Agaricus bisporus*, as well as of other commercially cultivated mushrooms (Mills et al., 2008). This disease is of economic importance and causes necrotic lesions and deformities on mushroom caps, making unviable for consumption, causing significant yield and quality losses in the mushroom industry (Berendsen et al., 2010). Control methods rely on rigorous hygiene procedures and targeted fungicide treatments (Grogan and Gaze, 2000; Chrysayi-Tokousbalides et al., 2007; Banks et al., 2019). However, the use of conventional chemical fungicides is gradually being limited due to their negative effects on human health, environmental safety, pathogen resistance, and legal availability due to government regulations. Therefore, development of new and effective control methods is necessary to minimize the use of chemicals in the mushroom industry (Gea et al., 2019).

Essential oils (EO) have been reported as promising natural antifungal products that constitute effective alternatives or complements to synthetic fungicides (Bakkali, et al., 2008; Lang and Buchbauer, 2012). They are a mixture of volatile compounds characterized by a strong odor and are formed during the secondary metabolism of aromatic plants (Bakkali et al., 2008). In addition to their well-documented antimicrobial properties (Burt, 2004), most of the EO are considered “generally recognized as safe” (GRAS) as food additives by the United States Food and Drug Administration (FDA), which makes them a potential bioresource of eco-friendly antifungal agents (Tisserand and Young, 2013; Oliveira et al., 2020).

The antifungal action of some essential oils has also been tested for the control of several fungal pathogens of *Agaricus bisporus*, such as *Mycogone pernicioso*,

Cladobotryum mycophilum and *Lecanicillium fungicola* (Sokovic and Van Griensven, 2006; Regnier and Combrinck, 2010; Abbaszadeh et al. 2014; Nazzaro et al., 2017; Santos et al., 2017; Gea et al., 2019). However, nothing is known about the mode of action, the dosage optimization or the synergistic effect of using multiple essential oils for the control of these fungi in the cultivation of *A. bisporus*. Thus, more detailed strategies need to be developed for a more practical and effective application of these antifungal natural products.

Saikia et al. (2013) evaluated the chemical composition and antimicrobial activity from the fruit and leaf essential oils of *L. cubeba* and obtained positive results with different levels of microbial inhibition depending on their particular chemical composition and all microbial strains appeared sensitive to the cytotoxic activity of the *L. cubeba* EO under investigation.

The aim of the present study was to characterize the chemical composition of EO, extracted from *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eugenia caryophyllus* (clove leaf) and *Litsea cubeba* (Chinese pepper); determine the effectiveness and mode of action of the above-mentioned EO in the control of three strains of *L. fungicola* by *in vitro* antifungal activity bioassays, and test the synergistic effect of these EO against the *L. fungicola* strains.

2. Material and Methods

2.1 *Lecanicillium fungicola* isolates

Three strains of *L. fungicola* were obtained and isolated from infected mushrooms with symptoms of dry bubble disease. Two strains were collected directly from *A. bisporus* mushrooms on a mushroom farm in Barbacena, Minas Gerais state, Brazil in 2019, and the third provided by UNESP, Dracena, São Paulo state, Brazil. The isolates were examined morphologically and molecularly to confirm their initial identifications and purity by microscopy and growth tests at 30°C for intraspecific varietal distinctions (Zare and Gams, 2008). Virulence assays were carried out according to Bonnen and Hopkins (1997) by drop inoculation (50 µL) on freshly harvested mushroom caps at a concentration of 10⁵ spore /mL of *L. fungicola*. Consequently, three strains of *L. f. var. fungicola* (LTL01, LTL02, LTL03) which demonstrated pathogenicity were used to determine the *in vitro* test of the antifungal activity and to assess the synergistic effect of the three EO.

2.2 Essential oils

The essential oils of *C. winterianus* (citronella), *E. caryophyllus* (clove leaf) and *L. cubeba* (Chinese pepper) used in this study were purchased from Ferquima® Ind. and Com. Ltda (São Paulo state, Brazil). The essential oils were stored under refrigeration in amber glass containers.

2.3 Chemical characterization of essential oils

Qualitative analyses were performed on a Shimadzu model QP 5050A gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC–MS). The chromatograph was equipped with a fused silica (5% phenyl, 95% dimethylpolysiloxane) capillary column

(Sigma-Aldric/Supelco) (30 m × 0.25 mm i.d.; 0.25 μm film), employing helium (White Martins), as the carrier gas at a flow rate of 1.18 mL min⁻¹. The volume of the sample injected was 1 μL diluted in hexane (Sigma-Aldrich®); the split ratio of the injected volume was 1:100; and the column pressure was 71.0 kPa. The oven temperature was programmed from 60°C for 2 minutes, increasing to 300°C at 3°C/min, where the temperature was maintained for 30 minutes. The injector and detector temperatures were 220°C and 300°C, respectively. The conditions of the mass spectrometer were the following: scanning detector 1000; scanning interval of 0.50 fragments; and fragments detected in the range of 45 to 500 Da. The MS employed an ion capture detector operating by electron impact and an impact energy of 70 eV. The comparison of the retention indices with those encountered in the literature was also utilized for identification of the components. The retention indices were calculated using the equation of Van den Dool and Kratz, (1963). Two libraries, NIST107 and NIST21, were also used for comparison of the spectral data.

Quantitative analyzes were performed using a Shimadzu GC-17A gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) under the following operational conditions: Rtx-5MS fused-silica (5% phenyl, 95% dimethylpolysiloxane) capillary column (30 m × 0.25 mm id; 0.25 μm film), using nitrogen as the carrier gas with a flow rate of 1.18 mL min⁻¹. The temperature was maintained at 60°C for 2 min and was then increased at the rate of 3 °C min⁻¹–240°C, followed by an increase of 10°C min⁻¹–300°C, where the temperature was maintained for 7 min. The injector temperature was 220°C, and the detector temperature was 240°C. A 1 μL volume of essential oil in hexane was applied to the column (Sigma-Aldrich, ≥98%). The compounds were identified using the NIST107 and NIST21 equipment libraries, and the retention indices

were calculated by the Van den Dool and Kratz equation (Van Den Dool and Kratz, 1963). The abundance of the identified compounds was expressed as relative peak areas (%).

2.4 Antifungal activity of essential oils

The effects of the EO (*C. winterianus*, *E. caryophyllus* and *L. cubeba*) on mycelial growth of *L. fungicola* strains (LTL01, LTL02 and LTL03) were evaluated using the agar diffusion method with potato dextrose agar (PDA) plates. Stock solutions were added at different concentrations separately to sterile PDA medium at 45°C prior to solidification to obtain concentrations of 1.0 and 0.1% of the essential oils. PDA medium without EO and PDA with mycelium of *L. fungicola* were used as controls. The oil-added medium was poured into sterile 90 mm diameter Petri dishes (20 mL/plate). After solidified, a 9 mm disc containing mycelium of *L. fungicola* was added to the center of each plate and incubated at 25 ± 2°C and 12 h photoperiod. After 15 days of incubation, the diameter of the fungal colony was measured using a digital caliper. The test was performed in triplicate. The percentage of inhibition (PI) of mycelial growth was determined as described by Billerbeck et al. (2001) using the following formula:

$$PI = \frac{X_0 - Y_T}{X_0} \times 100 \text{ (Equation 01) where:}$$

X_0 = rate of growth of the control;

Y_T = rate of the treated combinations.

2.5 Microdilution method

Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined in triplicate, using the broth micro-dilution procedure, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002). The solutions of EO were dissolved in Tween 80 0.5% and sterile water, and serial dilutions of the tested substances

(concentration of 1% of essential oils), culture medium (200 μ L of PD) and fungal inoculum (10 μ L of cell suspension 1.6×10^7 CFU/ mL, 530 nm, abs 0.08–0.1) were added to PDA plates. The plates were incubated for 24, 48, 72h and 07 and 15 days at 25°C. The MIC (the lowest concentration of the compound that inhibited visible growth of fungus) was determined (Yamaguchi et al., 2011).

The minimal fungicidal concentration (MFC) of the compounds were obtained by using a subculture of 10 μ L from the minimum-inhibitory-concentration wells (without visible growth) and transferred to Petri dishes containing PDA. After incubation for 72h at 25°C, the minimum fungicidal concentration was determined by the lowest concentration without fungus growth (Nakamura et al., 2016). Each test was performed in triplicate.

2.6 Assessing synergistic interaction between essential oils

Interactions of EO were determined using a checkerboard microdilution test described by White et al. (1996). Seven serial dilutions of the EO were prepared following the same method used to evaluate the MIC. Briefly, PD broth (100 μ L) and 10 μ L of working fungal inoculum (1.6×10^7 CFU/mL) were added to each well of a microtiter plate; 100 μ L of solution test essential oils in combination (1:1 v/v) of different concentrations ranging from 1% to 0.078% were added to the wells. For the double combinations, a two-dimensional checkerboard with dual dilutions of each EO was used. Growth control wells (medium with fungal inoculum, but without essential oils) were included in each microplate. Each test was done in triplicate. For the first clear well in each row of the microtiter plate containing all EO, the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated as follows:

$$FICI = FIC_{(A)} + FIC_{(B)}$$

$$FICI = \left(\frac{MIC_{A \text{ in combination}}}{MIC_{A \text{ alone}}} \right) + \left(\frac{MIC_{B \text{ in combination}}}{MIC_{B \text{ alone}}} \right)$$

(Equation 02) where:

FIC = Fractional inhibitory concentration

FICI = Fractional inhibitory concentration index

MIC = Minimum inhibitory concentration

The results were interpreted according to a FIC index (Kumar et al., 2012) as follows: synergy ($FICI \leq 0.5$); additive ($0.5 < FICI \leq 1$); and antagonistic ($FICI > 2$).

2.7 Scanning electron microscopy

Samples were collected from the fungal cultures with the lowest concentrations of essential oils tested (citronella 0.5%, Chinese pepper and clove leaf 0.01%). All collected samples were pre-fixed in modified Karnovsky fixer (2.5% glutaraldehyde, 2.5% formaldehyde in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.2) for a period of at least 24 h at 4 °C. After fixation, the standard protocol for scanning electron microscopy described by Bozzola and Russell (1999) with modifications was used. Samples were washed three times in 0.05 M phosphate buffer for 10 min each, and dehydrated in acetone gradient (25%, 50%, 75% and 90%, and three times 100%). After dehydration, acetone was removed using a Bal-Tec (Balzers, Liechtenstein) model CPD 030 critical point drier. Specimens were mounted on aluminum stubs with double face carbon tape on aluminum foil paper, covered with gold in a Bal-Tec (Balzers, Liechtenstein) model SCD 050 evaporator sputtering and then observed in a Nano Technology Systems (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) model Evo® 40 VP scanning electron microscope.

2.8 Mushroom cultivation and in vivo test

The *Agaricus bisporus* colonized compost was supplied by a mushroom farm (Sítio dos Micélios) from the city of Barbacena, Minas Gerais - Brazil. The casing layer material was prepared in two steps. The first one consisted in a mixture of soil (60%), limestone (30%) and sand (10%). This mixture was combined with charcoal in the proportion 75:25 (mixture: charcoal, v/v). The final mixture was autoclaved for 30 minutes at 121 °C.

The colonized compost was conditioned in pots (700g/pot). Before casing the pots were incubated at 25° C for a week to allow recovery of mushroom colonization. After that, 3 cm height of casing layer material was applied on the compost and watered.

On the third day after casing 5 mL of spore suspension of *L. fungicola* strain LTL03 (4.5×10^5 spores mL⁻¹) were sprayed on the casing layer for each pot, except for the control treatment. On the seventh day after casing, 5 mL of the essential oils for each concentration were sprayed on the casing for each pot, except for the control without essential oil. The emulsions of essential oils were prepared in 0.5% Tween 80, and, for each essential oil three concentrations were tested, citronella: 0.05%; 0.1% and 0.15%; cloves and Chinese pepper: 0.03%; 0.02% and 0.01%.

Three control treatments were used, being control 1: no pathogen inoculated and not treated with essential oils or fungicide; control 2: pathogen inoculated and no treated with essential oils or fungicide; control 03: pathogen inoculated and treated with fungicide on the seventh day, Manzate® WG (Mancozebe) 2 mg/mL. All treatments, except control 1 were kept together in a room at 25±3° C for casing-run. The control 1 was kept in a separate room in order to avoid its contamination with *L. fungicola*. Two weeks after, the casing layer was ruffled, and when it was completely colonized, the

environmental conditions were changed for fruiting induction, when the temperature was decreased to $19\pm 2^{\circ}$ and $85\pm 5\%$ relative humidity. The mushrooms were harvested, weighed and the severity of the disease symptoms assessed.

2.9 Statistical analysis

The statistical analysis of the data was performed using the SISVAR® program (Ferreira, 2011). The data were analyzed by ANOVA, followed by the Scott-knott test analysis ($P < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1 Chemical Composition of the Essential Oils

The chemical composition of the main compounds of the three EO is shown in Table 1. The main components of *C. winterianus* EO were citronellal (35.57%), citronellol (10.44%), geraniol (18.29%) and limonene (3.16%). In *E. caryophyllus* EO, eugenol (88.90%) and caryophyllene (10.16%) were the major components, while the main components of *L. cubeba* EO were geraniol (42.25%), neral (33.02%) and limonene (12.19%).

Generally, the major components present in the EO are responsible for determining the biological activity and are usually identified as aromatic compounds with low molecular weights (Bakkali et al., 2008). The qualitative and quantitative variations found in the chemical composition of essential oils can be attributed to several factors, but mainly to the factors related to the genetic characteristics of the species and the environmental conditions under which they were grown (climate, seasonality, and geography) (Gobbo-Neto and Lopes, N.P, 2007; Magalhães et al., 2019).

Table 1. Percentages of the main compounds of the essential oils from *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus* and *Litsea cubeba*.

Main compounds ^a	RT ^b	RI ^c	KI ^d	Conc. (%)
<i>Cymbopogon winterianus</i>				
Limonene	9.579	1031	1024	3.16
Citronellal	14.698	1158	1148	35.57
Citronellol	18.038	1235	1223	10.44
Geraniol	19.261	1263	1249	18.29
Citronellylacetate	23.595	1363	1350	1.95
Geranylacetate	24.966	1395	1379	2.43
β -Elemene	25.387	1405	1389	2.00
Germacrene D	26.043	1421	1484	1.76
Δ -Cadinene	30.454	1529	1522	2.47
α -Elemol	32.115	1571	1548	2.80
Germacrene D-4-ol	33.221	1599	1574	0.79
<i>Eugenia caryophyllus</i>				
Eugenol	24.109	1357	1356	88.90
Chavicol	24.717	1252	1247	0.33
Caryophyllene	26.660	1421	1417	10.16
α -Copaene	28.115	1377	1374	0.30
α -Humulene	33.570	1457	1452	0.29
<i>Litsea cubeba</i>				
α -Pinene	6.497	935	932	1.55
Camphene	6.950	950	946	0.51
Sabinene	7.678	975	969	0.83
β -Pinene	7.814	980	974	1.08
Myrcene	8.182	992	988	0.99
Limonene	9.584	1031	1024	12.19
1,8-Cineol	9.699	1034	1026	1.48
Linalol	12.381	1104	1095	1.07
Citronellal	14.680	1157	1148	1.18
Neral	18.686	1250	1235	33.02
Geraniol	19.334	1265	1251	0.69
Geranial	20.042	1281	1264	42.25
Caryophyllene	26.637	1435	1417	1.53

^a Compounds listed in order of elution from an HP-5 column. ^b Retention time (minutes).

^c Retention index calculated ^dKovats index.

3.2 Antifungal activity of essential oils

The tested EO showed antifungal activity, both, at 1% and 0.1% concentration, with 100% inhibition on the mycelial growth of the three strains of *L. fungicola* studied

at different incubation times. Santos et al. (2017) studied the effect of EO on the control of dry bubble disease and found that EO of lemon balm, eucalyptus and oreganum were inadequate to control *L. fungicola*.

The EO from *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Origanum vulgare* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and L.M. Perry, *Thymus vulgaris* L., *Zataria multiflora* Boiss, *Mentha arvensis* L. and *Satureja hortensis* L. showed strong *in vitro* activity against *L. fungicola* var. *fungicola* and others pathogens (Potocnik et al., 2015; Mehrparvar et al., 2016).

3.3 Determination of MIC and MFC values

The results of MIC and MFC presented the same values for the strains tested (Table 2). *Litsea cubeba* showed MIC activity at lower concentrations ($\geq 0.0156\%$). Based on the MFC results the inhibitory effect of the essential oils in defined concentrations was more efficient for *Litsea cubeba* than for *Cymbopogon winterianus* and *Eugenia caryophyllus*.

Thielmann and Muranyi (2019) reported that the EO of *Litsea cubeba* has antimicrobial properties and the minimum inhibitory concentration can vary between 0.05 and 2.5% for bacteria and fungi. Soković and Griensven (2006) reported a MIC $\geq 0.25\%$ for limonene for the control of *L. fungicola*. Limonene is the major compound in both citronella and Chinese pepper essential oils, which were used in the present work.

C. winterianus and *E. caryophyllus* showed MIC activity at higher activity at 15 days of observation ($\geq 0.125\%$) for *C. winterianus*, and ($\geq 0.0312\%$) for *E. caryophyllus* respectively. The MFC was as follows: *C. winterianus* ($\geq 0.25\%$), *E. caryophyllus* (0.125%) and *Litsea cubeba* ($\geq 0.0312\%$). Based on these results, the inhibitory effect of essential oils in defined concentrations was efficient, which is consistent with the findings

of other studies (Gucwa et al., 2018; El Amrani et al., 2019; Kaur et al., 2019). Horváth et al. (2016) reported the effect of *E. caryophyllus* EO on different microorganisms, finding MIC for *Candida albicans* (0.078%), *C. parapsilosis* (0.039%), *Aspergillus fumigatus* (0.156%), *Aspergillus terreus* (0.313%) *Fusarium solani* (0.313%), *Lichtheimia corymbifera* (0.313%) and *Rhizopus microsporus* (0.625%), and the results obtained with the *C. winterianus* EO were *Candida albicans* (0.039%), *C. parapsilosis* (0.078%), *Aspergillus fumigatus* (0.078%), *Fusarium solani* (0.156%), *Lichtheimia corymbifera* (>2.5%) and *Rhizopus microsporus* (>2.5%).

Table 2. Minimum Inhibitory and Fungicidal Concentrations of essential oils against *L. fungicola* (strains LTL01, LTL02 and LTL03). The MIC and MFC values are expressed as percentages % (v/v) and are the averages of the three strains.

EO	MIC		MFC
	7 days	15 days	5 days
<i>Cymbopogon winterianus</i>	≥ 0.125%	≥ 0.125%	≥ 0.25%
<i>Eugenia caryophyllus</i>	≥ 0.0312%	≥ 0.0312%	≥ 0.125%
<i>Litsea cubeba</i>	≥ 0.0156%	≥ 0.0156%	≥ 0.0312%

*P < 0.05 compared to minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) individual components.

Thus, EO at the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) resulted in a fungistatic effect (after 5 days incubation), demonstrating that the essential oils of Chinese pepper, citronella and clove leaf exerts antifungal activity on different strains of *L. fungicola*.

3.4 Antifungal activity in different concentrations EO

A 100% growth inhibition of the *L. fungicola* strain LTL01 was observed in the presence of *C. winterianus* (0.06; 0.05%), *E. caryophyllus* (0.03 and 0.02%) and *L cubeba* (0.03 and 0.02%), followed by 95% inhibition in the presence of *E. caryophyllus* 0.01%

and *L cubeba* 0.01% and 94% inhibition in the presence of *C. winterianus* 0.04% during the observed period (Figure 1).

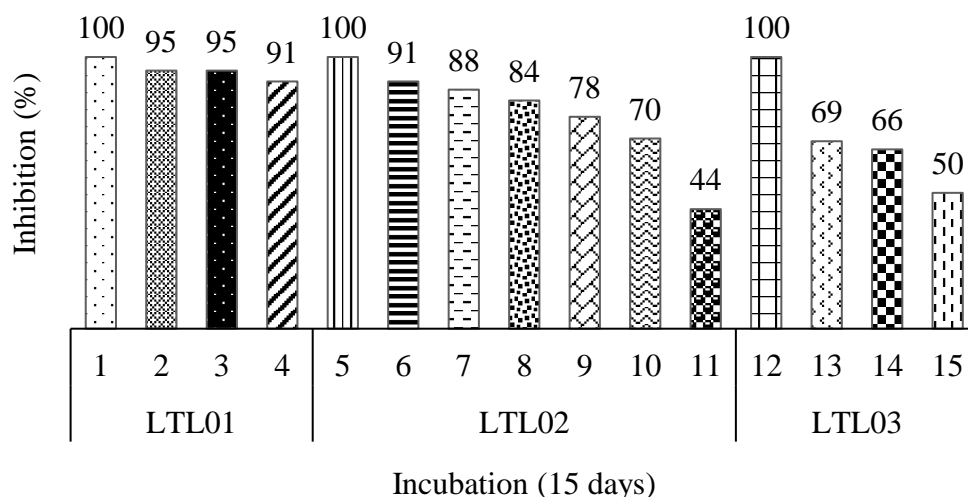


Figure 1. Growth inhibition of *L. fungicola* (LTL01, LTL02 and LTL03) in the presence of different essential oils. 1: *C. winterianus* (0.06; 0.05%); *E. caryophyllus* (0.03 e 0.02%); *L cubeba* (0.03 e 0.02%); 2: *L cubeba* 0.01%; 3: *E. caryophyllus* 0.01%; 4: *C. winterianus* 0.04%; 5: *E. caryophyllus* (0.03 e 0.02%); *L cubeba* (0.03%); 6: *E. caryophyllus* 0.01%; 7: *C. winterianus* 0.06%; 8: *L cubeba* 0.02%; 9: *C. winterianus* 0.05%; 10: *C. winterianus* 0.04%; 11: *L cubeba* 0.01%; 12: *C. winterianus* (0.5; 0.3; 0.25; 0.16; 0.15; 0.1); *E. caryophyllus* (0.06; 0.058; 0.05; 0.04; 0.03 e 0.02%); *L cubeba* a (0.03 e 0.02%); 13: *C. winterianus* 0.05%; 14: *E. caryophyllus* 0.01% e 15: *L cubeba* 0.01%.

The strain LTL02 was 100% inhibited in the presence of *E. caryophyllus* EO at the concentrations of 0.03 and 0.02%) and *L. cubeba* (0.03%). A less inhibitory effect was observed for the same EO at lower concentrations such as *E. caryophyllus* 0.01% (91% inhibition), *C. winterianus* 0.06% (88%), *L. cubeba* 0.02% (84%) and others.

LTL03 was tested with EO of *C. winterianus* at concentrations of 0.5; 0.3; 0.25; 0.16; 0.15; 0.1 and 0.05%, with total inhibition of mycelial growth observed in all concentrations tested, except for 0.05%. Similar results were observed for the EO of *E. caryophyllus*, for which concentrations of 0.06, 0.058; 0.05; 0.04; 0.03; 0.02 and 0.01% were tested, and all of them were effective, except for 0.01%, which did not inhibit the

fungal growth. For the EO of *L. cubeba*, concentrations of 0.03, 0.02 and 0.01% were tested; and, likewise, only the 0.01% concentration did not result in total fungal inhibition. Therefore, considering the three EO mentioned for this *L. fungicola* strain, concentrations from 0.02% OE were sufficient for its complete inhibition, except for OE of *C. winterianus*, for which a dose greater than 0.05%. These concentrations are much lower compared to those reported by Santos et al. (2017), which will be discussed later.

This study demonstrated that the essential oils of *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus* and *Litsea cubeba* have fungitoxic activity in the assay using the medium diffusion method. The activity of these essential oils on the strains tested was dependent on the concentration and type of oil. Likewise, there were clear differences in the sensitivity of fungal strains to different essential oils.

Santos et al. (2017) studied the effect of different EO against *L. fungicola* and observed that the lemon balm, eucalyptus and oregano EO were inadequate to control *L. fungicola*. On the other hand, according to the authors, the EO of cinnamon, thyme and cloves were the most effective in inhibiting the fungus and considered the most suitable for future studies of pathogen control in mushroom cultivation. These EO have been reported for their strong in vitro activity against *L. fungicola* and other pathogens (Potocnik et al., 2015; Mehrparvar et al., 2016), however, the concentration required for control should be taken into account. Santos et al. (2017) used concentrations of 0.4% (cloves and cinnamon) and 0.8% (thyme), which are relatively high, considering the cost of these products.

For the present study, the EO of cloves showed total inhibition of fungal growth at the concentration of 0.02%, which greatly reduces the cost of the product, corroborating the values reported by Lukovic et al. (2018), for the same OE. As previously mentioned,

the effects can vary greatly depending on the species, the type of OE, and, of course, the concentration of the active components in each production batch. It is interesting to note that, in order to control other species of fungi, much higher concentrations than those reported in this work may be necessary. According to Moraes et al., (2018), even using a concentration of 1.6% of citronella OE, mycelial growth of *Aspergillus* sp. was still observed, despite the colony diameter reduction of 75.6 (in the concentration of 0.2%) to 8 mm (in the concentration of 1.6%).

3.5 Synergistic effect between essential oils

The results obtained in the synergism test between the essential oils of *C. winterianus*, *E. caryophyllus* and *L. cubeba* tested against the LTL03 strain of *L. fungicola*, are presented in Table 3.

Table 3. Fractional inhibitory concentration indices (FICI) values in function of the different combinations of essential oils against *L. fungicola* (LT03).

Essential Oil	MIC (%)		MFC (%)		FIC/MFC	FICI	Result	
	A*	C**	A*	C**				
<i>C. winterianus</i> / <i>E. caryophyllus</i>	0.125	0.06	0.25	0.06	0.48	0.06	2.4	Synergism
<i>E. caryophyllus</i> / <i>L. cubeba</i>	0.0312	0.06	0.125	0.03	1.92	0.03	0.9	Indifferent
<i>L. cubeba</i> / <i>C. winterianus</i>	0.0156	0.007	0.0312	0.06	0.45	0.06	2.4	Synergism

A*= Alone, C** = Combination

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the EO of *C. winterianus* alone was 0.125%, while the MIC found in combinations with the other essential oils was

between 0.06 and 0.007%. The minimum fungicidal concentration (MFC) alone was 0.25%, while in combination, the MFC was 0.06%. The result of fractional inhibitory concentration (FIC) demonstrates that *C. winterianus* EO combined with the others tested had a synergistic effect.

E. caryophyllus EO alone showed an MIC value of 0.0312%, while the combination with *C. winterianus* resulted in 0.06%. The MFC value alone was 0.125%, while in combination, the MFC was 0.03%, and the FIC value was 1.92. These results demonstrate that the combination of the *E. caryophyllus* and *L. cubeba* EO had an indifferent effect. The *E. caryophyllus* EO when tested alone showed inhibitory effects on the growth of *L. fungicola* in lower concentrations when compared to *C. winterianus* EO.

The *L. cubeba* EO showed a MIC of 0.0156% when tested alone, and a MIC of 0.007% when combined with the other essential oils. The MFC was 0.0312% when tested alone and 0.06% when tested in combinations with *C. winterianus*. The FIC value was 0.45%, as was reported to Kumar et al. (2012), who observed a synergism when the EO of Chinese pepper was combined with EO of citronella.

Horváth et al. (2016) evaluated the interaction of citronella and clove essential oils against *Candida albicans*, as well as *Candida parapsilosis*, demonstrating an additive interaction. However, *Fusarium solani* behaved in a different way, since its answer was indifferent to the EO combination.

Synergies are known to occur for essential oil combinations, and it is, therefore, a field with countless opportunities to find potent antimicrobial blends effective at low concentrations. Our results demonstrated that the EO combination *L. cubeba* + *C. winterianus* or *C. winterianus* + *E. caryophyllus*, have a synergistic effect with a much

lower effective concentration and which may have efficacy in the control of dry bubble disease.

3.6 Scanning electron microscopy

The treatments with essential oils from the *in vitro* test, where fungal growth occurred, were subjected to scanning electron microscopy analysis, from the samples grown at the concentrations of citronella 0.05%, Chinese pepper and clove leaf 0.01%. It was observed that the EO change the hyphae morphology and dramatically decreased the amount of spores when compared to the control (Figure 2).

In samples treated with EO it is possible to observe changes in the aspects of hyphae and spores which assumed a roughness aspect. In addition, hyphae also started to show a more tangled organization when compared to the control. These results agree with Santos et al. (2017) who attested to the effectiveness of essential oils (cinnamon, thyme and cloves) in inhibiting mycelial growth and germination of *L. fungicola* spores. Sharma et al. (2017) reported similar results in a study about the effect of different EO on *Fusarium*, observing a drastic change in the morphology of hyphae and spores, and showed that the EO of cloves causes fragmentation and loss of the curvilinear characteristic of the spores. According to Alizadeh Behbahani et al. (2019) EO affected the bacterial cell membrane, increasing permeabilization of cells and damaging their integrity. Therefore, the effects of EO can go beyond the cell wall, bringing an even more drastic effect than a morphological alteration.

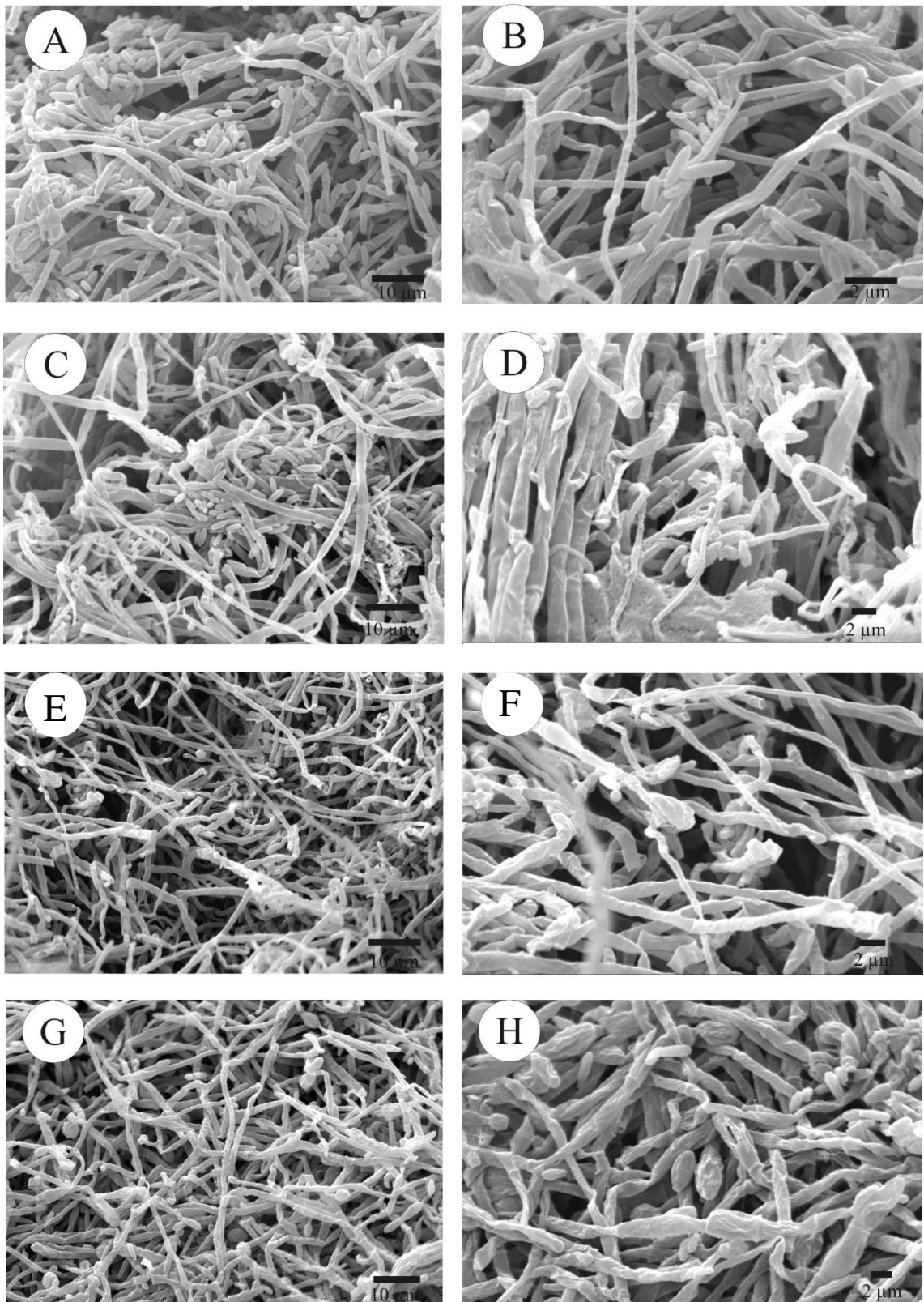


Figure 2. Scanning electron micrographs of *L. fungicola* under treatment of essential oils. (A and B: control; C and D: *C. winterianus* 0,05%; E and F: *E. caryophyllus* 0,01%; G and H: *L. cubeba* 0,01%).

Thus, synergistic antimicrobial effect and efficacy observed in this study open new perspectives about the development of new natural and potent antifungal blend against *L. fungicola* in the mushroom industry.

3.6 Control of *L. fungicola* by essential oils in the cultivation of *A. bisporus*

The use of essential oils for the control of pathogenic fungi in the mushroom cultivation raises the question whether the use of these oils would affect the production of mushrooms, assuming that essential oils have a fungicidal action and therefore may inhibit the mushroom growth. The results showed that the EO are efficient in controlling *L. fungicola*, but apparently does not affect the mushroom production (Table 2).

Soković and Van Griensven (2006) reported a pioneer study about the effect of different EO on the pathogens of the three major diseases of the white button mushroom: the fungi *Lecanicillium fungicola* and *Trichoderma harzianum* and the bacterium *Pseudomonas tolaasii*. According to the authors, the results indicate that oregano and thyme oils and their derivatives may be used as an alternative for the synthetic pesticides, however, further studies should be required for practical application. Later, Regnier and Combrinck (2010) reported an *in vivo* test using essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*, caused by the fungus *Mycogone perniciosa*. The authors found that thyme and lemon verbena oil may be of potential use to control *Mycogone perniciosa* in button mushroom production.

Santos et al. (2017), reported the action of essential oils (cloves, cinnamon and thyme) pre and post-infestation to control *L. fungicola* during *A. bisporus* cultivation. It was observed a lower incidence of the disease when EO were applied post-infestation depending on the strain. The effect was observed for a strain, whereas for another strain

the moment of application of EO did not differ. The authors claim that the efficiency of any treatment is related to the genetic variability of the pathogen, and suggest the use of combined EO as a safer way to investigate the effectiveness of the treatment.

In addition to controlling diseases that affect the button mushroom, essential oils also have benefits in post-harvest. Gao et al. (2014) reported that the fumigation of EO soon after harvest can inhibit the senescence of mushrooms, browning, loss of weight, firmness and mushroom caps opened. All of these factors affect the quality of the mushrooms.

As can be seen in Table 2, the best productivity was obtained from the treatments with the EO of clove leaves and Chinese pepper, which did not differ statistically from control 1, which was not inoculated with the pathogen nor received any type of treatment. There were also no significant differences between the concentrations tested for these EO. Among all these treatments, the mushroom productivity ranged from 19.9 to 24.5%, with the highest productivity value being obtained in the treatment with 0.02% leaf cloves EO.

Only citronella EO showed lower productivity, similar to the inoculated and untreated control. In this case, the results were similar for all concentrations tested. Similarly, no significant differences were observed between these treatments and control 3, which consisted of using the commercial fungicide Manzate®. Although this fungicide was effective in controlling *L. fungicola* in the *in vitro* tests, the same effect was not observed *in vivo*.

Table 4. Button mushroom production in function of *L. fungicola* inoculation and essential oils treatments.

Treatment	Mushroom yield (g)	Mushroom number	Mushroom weight average (g)	Productivity (%)	Disease incidence
Control 1	195.0 a	63	15,8	22,3 a	0.0
Clove leaf 0,03%	184.5 a	69	17.3	23.3 a	0.8
Clove leaf 0.02%	182.5 a	64	16.0	24.5 a	0.8
Clove leaf 0.01%	165.7 a	63	15.8	22.1 a	1.0
Chinese pepper 0.01%	179.7 a	60	15.0	22.7 a	2.2
Chinese pepper 0.02%	169.0 a	56	14.0	22.5 a	0.8
Chinese pepper 0.03%	166.0 a	56	14.0	19.9 a	2.0
Control 3 (Manzate®)	139.2 b	51	12.8	17.5 b	2.0
Citronella 0.1%	128.5 b	36	9.0	14.7 b	1.8
Control 2 (inoculated)	110.5 b	40	10.0	13.1 b	1.8
Citronella 0.05%	109.0 b	35	8.8	13.4 b	1.8
Citronella 0.15%	95.5 b	38	9.5	11.7 b	2.5
CV: 30.99%					

As discussed before, EO have already been tested for the control of the main pathogens of the major diseases of the white button mushroom, such as *Mycogone perniciosa*, *L. fungicola* and *Trichoderma harzianum* (Sokovic & Van Griensven, 2006; Regnier & Combrink, 2010; Mehrparvar et al. 2016; Santana Nunes et al. 2017). Despite this, most of these works have been done only *in vitro* studies, emphasizing the need for

practical studies (Sokovic & Van Griensven, 2006). Therefore, the present work shows a complete study, approaching the screening of EO, their concentration and *in vivo* test.

The higher productivity observed in the treatments with clove leaf and Chinese pepper EO showed the potential of their use for the control of the dry bubble, caused by *L. fungicola*. However, despite ensuring high productivity, the use of essential oils did not show 100% efficiency in controlling the pathogen, since, in all EO treatments, there was an incidence of disease symptoms (Table 2. Figure 3). On average, the incidence of the disease was lower in these treatments, when compared to the second group of treatments. However, for some treatments, such as 0.01% Chinese pepper EO, an average of 2.2 mushrooms per pot with symptoms of the disease was observed (Table 2). On the other hand, among the 6 treatments with the best productivity results, 4 of them showed an average of only 0.8 to 1.0 mushroom per pot with symptoms of the disease. For the second group, which had significantly lower productivity, the average of mushrooms with symptoms ranged from 1.8 to 2.5 per pot. Probably, for this group, the action of the pathogen was not limited to the symptoms in the mushrooms, but it can also affect the mycelium of the mushroom in the casing layer or in the compost.

Considering the variations observed in the different strains of pathogens, mushroom strains and even in the different growing conditions, the effective use of essential oils to control mushroom pathogens still requires further studies. In addition to preventing the decrease of mushroom production, it will also be important to ensure that they are produced without disease symptoms, as this can drastically reduce their market value. The results found are promising, since the treatments with EO of Chinese pepper and clove leaves provided a productivity equivalent to the control. In addition, there was a reduction in the manifestation of the disease symptoms in these treatments. Therefore,

new studies should aim to increase the effectiveness of essential oils in the control of pathogens in the cultivation of *A. bisporus*.

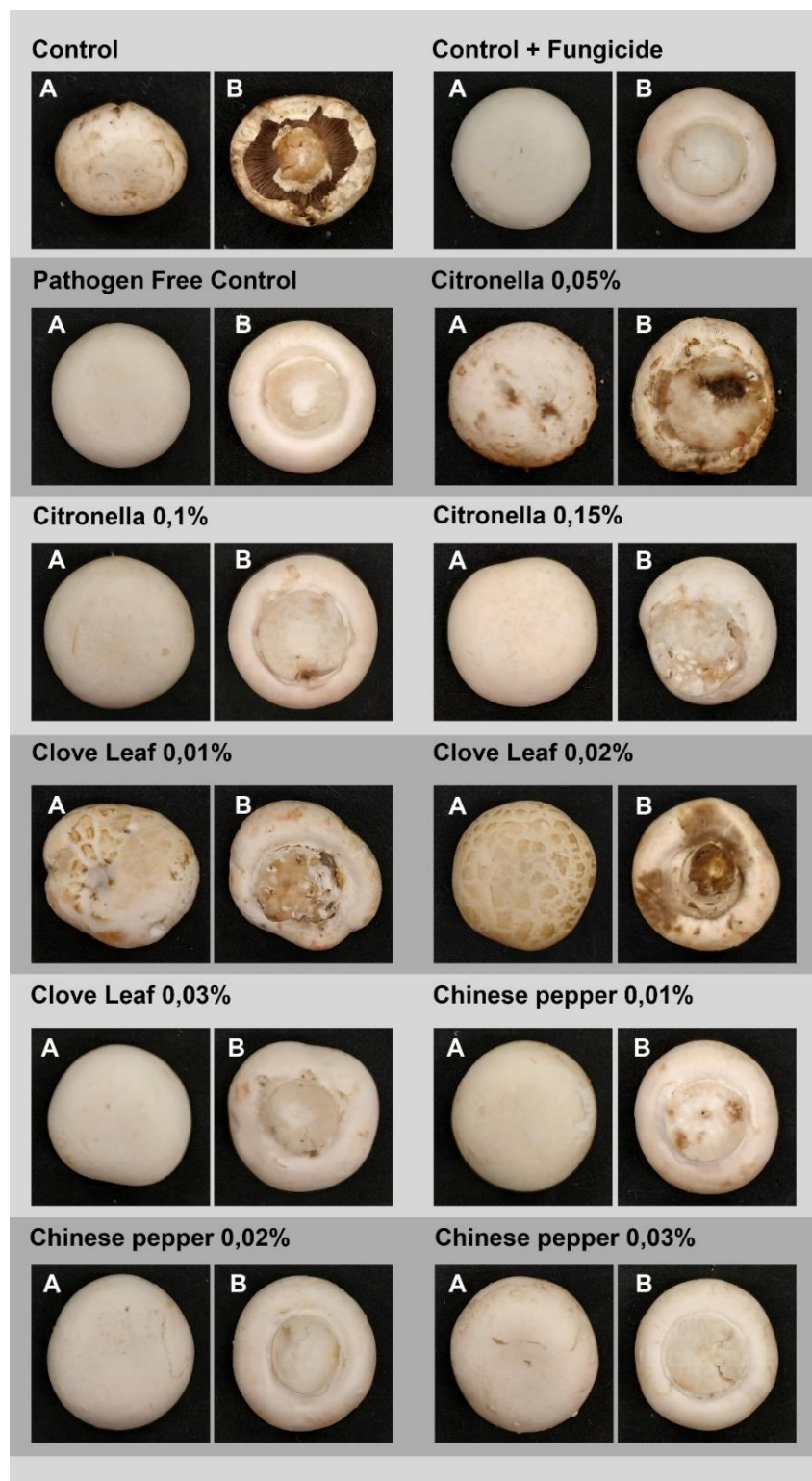


Figure 3. Photographs of the mushrooms that were collected at the point of harvest, infected with *L. fungicola* and sprayed with different concentrations of essential oils, in some treatments showing the symptoms of dry bubble disease.

Although EO have strong aromatic aroma as their main characteristic, no changes in the organoleptic characteristics of the mushrooms were observed in this study.

4. Conclusions

Litsea cubeba showed MIC activity at lower concentrations. Based on the MFC results the inhibitory effect of EO in defined concentrations was more efficient on *L. cubeba* than on *C. winterianus* and *E. caryophyllus*.

The EO of *L. cubeba* and *C. winterianus* or *C. winterianus* and *E. caryophyllus* combined have a synergistic effect with a much lower inhibitory concentration.

For practical application, clove leaf and Chinese pepper EO treatments resulted in higher productivity, showing greater potential for use. However, future studies should be required, with higher concentrations or with the combination of these two oils, in order to eliminate any symptoms of the disease.

5. References

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de mycologie medicale*, 24, 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
- Adams. R.P.. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th editio. ed. Allured Pub Corp.
- Behbahani, B. A., Noshad, M., & Falah, F. 2019. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial pathogenesis*, 136, 103716. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103716>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46, 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Banks, A. M., Aminuddin, F., Williams, K., Batstone, T., Barker, G. L., Foster, G. D., & Bailey, A. M. 2019. Genome Sequence of *Lecanicillium fungicola* 150-1, the Causal Agent of Dry Bubble Disease. *Microbiology resource announcements*, 8. [HTTPS://doi:10.1128/mra.00340-19](https://doi.org/10.1128/mra.00340-19)
- Berendsen, R. L., Baars, J. J., Kalkhove, S. I., Lugones, L. G., Wösten, H. A., & Bakker, P. A. 2010. *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular plant pathology*, 11, 585-595. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00627.x>
- de Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. 2001. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian journal of microbiology*, 47, 9-17. <https://doi.org/10.1139/w00-117>
- Bonnen, A. M., & Hopkins, C. 1997. Fungicide resistance and population variation in *Verticillium fungicola*, a pathogen of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 101, 89-96. <https://doi.org/10.1017/S0953756296002237>
- Bozzola, J. J., & Russell, L. D. 1999. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones & Bartlett Learning.
- Burt. S.. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94. 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Chrysai-Tokousbalides, M., Kastanias, M. A., Philippoussis, A., & Diamantopoulou, P. 2007. Selective fungitoxicity of famoxadone, tebuconazole and trifloxystrobin between *Verticillium fungicola* and *Agaricus bisporus*. *Crop Protection*, 26, 469-475. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.02.016>

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. second ed CLSI. Wayne. PA. NCCLS document M27-A2.

Lalami, A. E. O., Moukhafi, K., Bouslamti, R., & Lairini, S. 2019. Evaluation of antibacterial and antioxidant effects of cinnamon and clove essential oils from Madagascar. *Materials Today: Proceedings*, 13, 762-770. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.04.038>

Ferreira, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

Gao, M., Feng, L., & Jiang, T. 2014. Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. *Food chemistry*, 149, 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.073>

Gea, F. J., Navarro, M. J., Santos, M., Diáñez, F., & Herraiz-Peñalver, D. 2019. Screening and Evaluation of Essential Oils from Mediterranean Aromatic Plants against the Mushroom Cobweb Disease, *Cladobotryum mycophilum*. *Agronomy*, 9, 656. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100656>

Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, 30, 374-381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

Grogan, H. M., & Gaze, R. H. 2000. Fungicide resistance among *Cladobotryum* spp. causal agents of cobweb disease of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 104, 357-364. <https://doi:10.1017/S0953756299001197>.

Gucwa, K., Milewski, S., Dymerski, T., & Szweda, P. 2018. Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* essential oils. *Molecules*, 23, 1116. <https://doi:10.3390/molecules23051116>

Horváth, G., Jenei, J. T., Vágvölgyi, C., Böszörményi, A., & Krisch, J. 2016. Effects of essential oil combinations on pathogenic yeasts and moulds. *Acta Biologica Hungarica*, 67, 205-214. <https://doi.org/10.1556/018.67.2016.2.8>

Kaur, G., Ganjewala, D., Bist, V., & Verma, P. C. 2019. Antifungal and larvicidal activities of two acyclic monoterpenes; citral and geraniol against phytopathogenic fungi and insects. *Archives of phytopathology and plant protection*, 52, 458-469. <https://doi.org/10.1080/03235408.2019.1651579>

Kumar, S. N., Siji, J. V., Nambisan, B., & Mohandas, C. 2012. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 3143-3150. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1124-0>

Lang, G., & Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *A review. Flavour and Fragrance Journal*, 27, 13-39. <https://doi.org/10.1002/ffj.2082>

- Luković, J., Stepanović, M., Todorović, B., Milijašević-Marčić, S., Duduk, N., Vico, I., & Potočnik, I. 2018. Antifungal activity of cinnamon and clove essential oils against button mushroom pathogens *Cladobotryum dendroides* (Bull.) W. Gams & Hooz and *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* (Preuss) Hasebrauk. *Pesticidi i fitomedicina*, 33, 19-26. <https://doi.org/10.2298/pif1801019l>
- Magalhães, M. L., Ionta, M., Ferreira, G. Á., Campidelli, M. L. L., Nelson, D. L., Ferreira, V. R. F., ... & Cardoso, M. D. G. 2020. Biological activities of the essential oil from the Moro orange peel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Flavour and Fragrance Journal*, 35, 294-301. <https://doi.org/10.1002/ffj.3561>
- Mehrpour, M., Goltapeh, E. M., Safaie, N., Ashkani, S., & Hedesh, R. M. 2016. Antifungal activity of essential oils against mycelial growth of *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* and *Agaricus bisporus*. *Industrial Crops and Products*, 84, 391-398. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.012>
- Mills. P.R.. Thomas. J.. Sergeant. M.R.. Costa. A.. Collopy. P.D.. Bailey. A.M.. Foster. G.D.. Challen. M.P. 2008. Interactions between *Agaricus bisporus* and the pathogen *Verticillium fungicola*. p 1–17. In Avery SV. Stratford M. van West P (ed). *Stress in yeasts and filamentous fungi*. 1st ed. vol 27. Academic Press. London. United Kingdom.
- Moraes, S. D. P. C. B., Moraes, W. B., Moraes, W. B., de Resende Camara, G., Maciel, K. E. S., de Lima, P. A. M., ... & Lopes, J. C. 2018. Cinnamon and citronella essential oils in the *in vitro* control of the fungi *Aspergillus* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. *African Journal of Agricultural Research*, 13, 1811-1815. <https://doi.org/10.5897/AJAR2018.13074>.
- Nakamura. M.. Endo. E.. de Sousa. J.P.. Callejon. D.. Ueda-Nakamura. T.. Dias Filho. B.. de Freitas. O.. Nakamura. C.. Lopes. N.. 2016. Copaiba Oil and Its Constituent Copalic Acid as Chemotherapeutic Agents against Dermatophytes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 28. 1377–1383. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160309>
- Nazzaro. F.. Fratianni. F.. Coppola. R.. De Feo. V.. 2017. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*. 10.86. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Oliveira, R. C., Carvajal-Moreno, M., Correa, B., & Rojo-Callejas, F. 2020. Cellular, physiological and molecular approaches to investigate the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of thyme essential oil on *Aspergillus flavus*. *Food chemistry*, 315, 126096. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126096>
- Potočnik, I., Stepanović, M., Rekanović, E., Todorović, B., & Milijašević-Marčić, S. 2015. Disease control by chemical and biological fungicides in cultivated mushrooms: button mushroom, oyster mushroom and shiitake. *Pesticidi i fitomedicina*, 30, 201-208. <https://doi.org/10.2298/PIF1504201P>
- Regnier, T., & Combrinck, S. 2010. *In vitro* and *in vivo* screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. *South African Journal of Botany*, 76, 681-685. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.07.018>

- Saikia, A. K., Chetia, D., D'Arrigo, M., Smeriglio, A., Strano, T., & Ruberto, G. 2013. Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. from north-east India—chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*, 25, 330-338. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.775081>
- Santana Nunes, J., Rocha de Brito, M., Cunha Zied, D., A. Graças Leite, E., Souza Dias, E., Alves, E., 2017. Evaluation of the infection process by *Lecanicillium fungicola* in *Agaricus bisporus* by scanning electron microscopy. *Revista iberoamericana de micologia*, 34, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.04.006>
- Santos, T. L. D., Belan, L. L., Zied, D. C., Dias, E. S., & Alves, E. 2017. Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. *Ciência Rural*, 47(5). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160780>
- Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., & Kundu, B. 2017. 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*, 123, 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>
- Soković, M., & Van Griensven, L. J. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of plant pathology*, 116, 211-224. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9053-0>
- Thielmann, J., & Muranyi, P. 2019. Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene. *Journal of essential oil research*, 31, 361-378. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1611671>
- Tisserand, R., Young, R., 2013. *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*. (2th ed.). London: Churchill Livingstone. (Chapter 15). <https://doi.org/10.1016/C2009-0-52351-3>
- White, R.L., Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Ag Chemother*. 40:1914–1918.
- Yamaguchi, M.U., Garcia, F.P., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Filho, B.P.D., Nakamura, C.V., 2011. Antifungal effects of *Ellagitannin* isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 99, 507–514. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9516-3>
- Zare, R., Gams, W., 2008. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycol. Res.* 112, 811–824. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.019>