

PAULA LEITE DOS SANTOS

**MANEJO DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. EM SEMENTES DE
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) COM ÓLEOS ESSENCIAIS E
ANTAGONISTAS**

Botucatu

2018

PAULA LEITE DOS SANTOS

**MANEJO DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. EM SEMENTES DE
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) COM ÓLEOS ESSENCIAIS E
ANTAGONISTAS**

Tese apresentada a Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para a obtenção do título de doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Zanin Kronka

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S237m Santos, Paula Leite dos, 1985-
Manejo de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com óleos essenciais e antagonistas / Paula Leite dos Santos. - Botucatu: [s.n.], 2018
71 p.: il., grafs., tabs.

Tese(Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientador: Adriana Zanin Kronka
Inclui bibliografia

1. Feijão comum - Sementes - Doenças e pragas. 2. Pragas agrícolas - Controle biológico. 3. *Macrophomina phaseolina*. I. Kronka, Adriana Zanin. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

Ficha elaborada por : Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255
"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

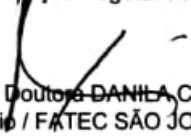
TÍTULO DA TESE: MANEJO DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. EM SEMENTES DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) COM ÓLEOS ESSENCIAIS E ANTAGONISTAS

AUTORA: PAULA LEITE DOS SANTOS

ORIENTADORA: ADRIANA ZANIN KRONKA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA
Depto de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP


Professora Doutora DANILA COMELIS BERTOLIN
Agronegócio / FATEC SÃO JOSÉ DO RIO PRETO


Dra. MARILEIA REGINA FERREIRA
SAAE/SP Mogi / Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo


Dra. MARTHA MARIA PASSADOR
Depto. Fitossanidade / Instituto Agrônomo de Campinas


Profa. Dra. SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN
Departamento de Produção Vegetal / FCA / UNESP - Botucatu/SP

Botucatu, 22 de janeiro de 2018

OFEREÇO

A Deus por me conduzir sempre pelo melhor caminho, me ajudando a enfrentar as adversidades, me tornando uma pessoa melhor a cada dia.

DEDICO

Aos meus avós, Ana (*in memoriam*) e Sebastião, por me ensinarem o valor do trabalho honesto, do amor incondicional e da vontade de viver.

Aos meus amados pais, Oneida e Djalma, por todo amor, carinho, incentivo, paciência e dedicação.

Às minhas Irmãs, Fabiana e Alexandra, por serem minhas grandes amigas, meus amores, essenciais em minha vida.

Aos meus queridos sobrinhos, Marcos Vinícios e Davi, por todo carinho, alegria, amor e orgulho que me proporcionam desde o primeiro minuto de suas vidas.

À minha sogra, Eliana, pelo apoio, amor e carinho.

Ao meu amado Guilherme, Por todo amor, dedicação, apoio, compreensão.

Amo Vocês

AGRADECIMENTOS

À professora Adriana Zanin Kronka, pela orientação, amizade, confiança e incentivo. Sendo sempre muito dedicada, atenciosa, carinhosa e presente. Sou grata por poder fazer parte da sua vida!

À Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos, apoio e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Proteção de Plantas, pelo carinho e amizade.

À Gleice Viviane Nunes Pereira, Rafaela Morando, Tássia Campanhã, Nice Leite, Daniele Nascimento, Tadeu Fernandes e João César Silva, pela grande amizade, apoio, amor e carinho. Por sempre acreditarem em minha capacidade, me apoiando em todos os passos de minha vida. Direta ou indiretamente, vocês contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

Ao amigo Vinicius Bello, por contribuir com o isolado de *M.phaseolina*, além de me auxiliar quando necessário.

Aos amigos do Departamento de Proteção de Plantas, Marcelo Soman, Giovana Cruciol, Ronaldo Caravieri, Luís Watanabe, Felipe Barreto e Marcos R. Ribeiro, pelos momentos de descontração, carinho, apoio e amizade.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) está sujeito à ocorrência de doenças, cujos agentes causais podem ser transportados e transmitidos via sementes, além de comprometer o potencial fisiológico destas. Dentre os patógenos que influenciam negativamente, se presentes nas sementes de feijão, está o fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., que pode ser transmitido às plantas, causando a podridão cinzenta da haste do feijoeiro, uma doença com sérios impactos na cultura. Apesar do tratamento químico de sementes ser uma prática eficiente no controle de patógenos, o emprego de substâncias naturais com ação fungicida e de antagonistas de fitopatógenos surge como uma opção de manejo sustentável. Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do tratamento de sementes de feijão com óleos essenciais (Capítulo I) e antagonistas (Capítulo II) sobre a incidência do fungo *M. phaseolina* e o potencial fisiológico das sementes tratadas. No primeiro capítulo, inicialmente, investigou-se a ação *in vitro* dos óleos essenciais de cravo da Índia, pimenta preta e gerânio sobre o crescimento micelial e a esporulação do fungo. Dois tratamentos testemunha foram incluídos: fungicida tiofanato metílico + fluazinam e BDA puro. Verificou-se inibição total do crescimento micelial pelos óleos essenciais de cravo da Índia e pimenta preta, com ação semelhante ao fungicida. O óleo essencial de gerânio não apresentou efeito inibitório satisfatório sobre o fungo. Os óleos essenciais de cravo de Índia e pimenta preta foram então empregados no tratamento de sementes de feijão, para averiguar seu potencial de controle de *M. phaseolina* e possíveis efeitos na qualidade fisiológica das sementes tratadas. Os óleos essenciais foram comparados ao fungicida tiofanato metílico + fluazinam, sendo também avaliadas sementes inoculadas sem tratamento e sementes não inoculadas. Os óleos essenciais reduziram a incidência do fungo nas sementes, porém, o óleo essencial de cravo da Índia provocou uma redução na germinação destas. Apesar disto, não houve interferência negativa deste óleo sobre o vigor das sementes, avaliado pela primeira contagem de germinação e índice de velocidade de emergência. O óleo essencial de pimenta preta, por sua vez, reduziu a incidência do fungo e não interferiu na germinação e vigor das sementes. O experimento de controle biológico (Capítulo II) também foi constituído inicialmente de uma etapa *in vitro*, para verificar a possível ação dos antagonistas *Bacillus*

subtilis, *B. pumilus* e *Trichoderma harzianum* sobre *M. phaseolina*. Constatou-se a ação supressora dos antagonistas, com a formação de halo de inibição no teste de confronto em todos os tratamentos. Em seguida, foi realizado o tratamento de sementes com os antagonistas e o fungicida tiofanato metílico + fluazinam, sendo também incluídas no experimento sementes inoculadas e sementes não inoculadas, ambas sem tratamento. Foram avaliados a sanidade e o potencial fisiológico (germinação; primeira contagem de germinação; índice de velocidade de emergência; comprimento de plântulas). Os três antagonistas reduziram a incidência de *M. phaseolina* nas sementes. Em geral, *B. subtilis* e *T. harzianum* mostraram resultados consistentes e satisfatórios, quanto à germinação e primeira contagem de germinação. Não houve diferença entre os tratamentos quanto ao índice de velocidade de emergência e comprimento de plântulas. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o óleo essencial de pimenta preta e os antagonistas *B. subtilis* e *T. harzianum* são alternativas viáveis para o manejo de *M. phaseolina* em sementes de feijoeiro.

Palavras-chave: Podridão cinzenta da haste do feijoeiro, patologia de sementes, controle alternativo, controle biológico.

ABSTRACT

Common bean crop (*Phaseolus vulgaris* L.) is subject to diseases occurrence, whose causal agents can be transported and transmitted through seeds, besides compromising their physiological potential. *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. is one of the pathogens that negatively influences this potential, if present in common bean seeds. This fungus can be transmitted to the plants, causing charcoal rot of common bean, a disease with serious impacts on this crop. Although the chemical treatment of seeds is an efficient practice in the pathogens control, the use of natural substances with fungicidal action and antagonists of phytopathogens appears as a sustainable management option. This research aimed to evaluate the effect of common bean seeds treatment with essential oils (Chapter I) as well as antagonists (Chapter II) on the incidence of *M. phaseolina* and the physiological potential of the treated seeds. In the first chapter, the *in vitro* action of clove, black pepper and geranium essential oils on mycelial growth and fungal sporulation was investigated. Two control treatments were included: methyl thiophanate + fluazinam fungicide and pure potato-dextrose-agar (PDA). Total inhibition of mycelial growth was verified by clove and black pepper essential oils, which showed a fungicide-like action. The geranium essential oil had no satisfactory inhibitory effect on the fungus. Clove and black pepper essential oils were used in the common bean seeds treatment in order to determine their potential for *M. phaseolina* control and possible effects on the physiological quality of treated seeds. The essential oils treatments were compared with the methyl thiophanate + fluazinam fungicide one. Inoculated and uninoculated seeds were also evaluated. The essential oils reduced the fungus incidence in the seeds, however, clove essential oil caused a germination reduction. In spite of this, there was no negative interference of this oil in seed vigor, evaluated by the first germination count and the emergence speed index. Black pepper essential oil reduced the incidence of the fungus and did not interfere in seeds germination and vigor. The biological control experiment (Chapter II) was also initially comprised an *in vitro* stage in order to verify the possible action of the antagonists *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* and *Trichoderma harzianum* on *M. phaseolina*. The suppressive action of the antagonists was observed, with an inhibition halo production in the challenge test for all treatments. Then, seed treatment was performed by using antagonists and methyl

thiophanate + fluazinam fungicide. Inoculated and uninoculated seeds were also included in the experiment, both without treatment. Seed health and physiological potential (germination, first germination count, emergence speed index and seedlings length) were evaluated. All the antagonists reduced the incidence of *M. phaseolina* in the seeds. In general, *B. subtilis* and *T. harzianum* showed consistent and satisfactory results regarding germination and first germination counting. There was no difference among the treatments for emergence speed index and seedling length. From the results obtained, it can be concluded that black pepper essential oil, *B. subtilis* and *T. harzianum* are viable alternatives for *M. phaseolina* management in common bean seeds.

Keywords: Charcoal rot of common bean, seed pathology, alternative control, biological control

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1 - Tratamento de sementes de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) com óleos essenciais para o manejo de <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.....	25
1.1 Introdução	26
1.2 Material e Métodos	28
1.3 Resultados e discussão	32
Referências	36
CAPÍTULO 2 - Manejo de <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid. com agentes biológicos e suas implicações na qualidade fisiológica de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	43
2.1 Introdução	44
2.2 Material e Métodos	46
2.3 Resultados e Discussão	51
Conclusão	55
Referências	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	65

INTRODUÇÃO GERAL

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em quase todo o território nacional, constituindo-se a base da alimentação do seu povo e, assim, adquirindo alta expressão econômica e social. O feijão é um alimento amplamente utilizado na alimentação humana, sendo fonte de nutrientes essenciais, como proteínas, cálcio, ferro, zinco, magnésio, vitaminas, carboidratos e fibras. É também a principal fonte proteica das populações de baixa renda, destacando-se nutricional, social e economicamente. Além disso, o feijão é um alimento cultural e tradicional da dieta dos brasileiros, sendo consumido diariamente por grande parte da população (MESQUITA et al., 2007).

O feijoeiro comum possui boa adaptação edafoclimática, possibilitando, assim, que seja cultivado durante todo ano em quase todo território brasileiro. No Brasil, seu cultivo é realizado em três safras: a “safra das águas” (primeira), a “safra da seca” (segunda) e a “safra de outono/inverno” (terceira). Na Região Centro-Sul, o plantio da primeira safra ocorre de agosto a dezembro e a colheita, de novembro a fevereiro; na Região Norte-Nordeste, o plantio ocorre em novembro e dezembro, e a colheita, de janeiro a março. Na segunda safra, o plantio ocorre de dezembro a março, em todos os Estados brasileiros, com colheita entre março e julho. O plantio da terceira safra ocorre de abril a julho, com colheita sendo realizada de julho a outubro (SALVADOR, 2012). Segundo o primeiro levantamento de safra 2017/2018, estima-se queda na produtividade de aproximadamente 0,8% no feijão-comum cores e de 0,5% no feijão-comum preto. De acordo com a avaliação de cultivo da primeira safra, a área total semeada pode variar de 1.019,7 a 1.053,5 mil hectares, com produtividade esperada de aproximadamente 1.209 Kg/ha, ou seja, a produção média prevista é de 1.253,2 mil toneladas (Conab, 2017).

Apesar de ser uma cultura amplamente cultivada com altas estimativas de produtividade, alguns problemas fitossanitários, como a ocorrência de doenças, podem causar grandes prejuízos de nível econômico. A incidência de patógenos na cultura do feijoeiro comum causa perdas na qualidade fisiológica de sementes e desuniformidade na germinação, interferindo no estabelecimento do estande inicial (CARVALHO et al., 2011a). Além disso, as sementes são importantes veículos para a introdução e disseminação de patógenos em regiões onde estes ainda não

ocorrem. Dentre os vários patógenos de importância epidemiológica que podem comprometer a produção e a qualidade das sementes de feijão, está o fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., causador da podridão cinzenta da haste do feijoeiro. Este fungo é considerado um dos mais importantes e destrutivos patógenos necrotróficos habitantes de solos, podendo infectar mais de 500 espécies de plantas, incluindo o feijão comum, feijão caupi, milho, sorgo, soja, amendoim e crotalária, sendo estas as espécies mais comuns e suscetíveis no Brasil (GUPTA et al., 2012).

Quando o solo encontra-se contaminado pelo fungo e sementes de cultivares suscetíveis são semeadas, ou quando são utilizadas sementes contaminadas, sintomas como "damping-off", de pré ou pós-emergência podem ocorrer, reduzindo o stand de germinação (WENDLAND et al., 2016). Além da possibilidade de transmissão de *M. phaseolina* para plântulas por meio de sementes infectadas, estas também constituem uma importante via de disseminação do patógeno (ALMEIDA et al., 2014; WENDLAND et al., 2016).

O controle da podridão cinzenta inclui o emprego de sementes saudáveis e o tratamento de sementes, além de práticas culturais que objetivam a redução do potencial de inóculo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978). A utilização do controle químico também é realizada, sendo indicados para o controle de *M. phaseolina* os fungicidas carboxina (carboxanilida) + tiram (dimetildiocarbamato), fludioxonil (fenilpirrol), difenoconazol (triazol) (AGROFIT, 2017).

A melhor forma de reduzir a disseminação de patógenos via sementes é o emprego de sementes livres de contaminações ou dentro de padrões de tolerância estabelecidos para a cultura. Do ponto de vista sanitário, isso equivale a dizer que a semente ideal seria aquela livre de qualquer microrganismo indesejável, o que nem sempre é possível, uma vez que a qualidade sanitária das sementes é altamente influenciada pelas condições climáticas sob as quais estas foram produzidas e armazenadas (GOULART, 1998).

O tratamento de sementes pode ser entendido como qualquer operação que envolva as sementes, pelo manejo através da incorporação de produtos químicos ou biológicos, e/ou pela utilização de agentes físicos, visando a melhoria ou garantia do seu desempenho em condições de cultivo. Especificamente para o controle de patógenos, o tratamento de sementes pode ser praticado, utilizando-se métodos químicos, físicos, biológicos ou a combinação destes (ZAMBOLIM, 2004). Esta

prática tem baixo custo e seu efeito sobre o ambiente é bastante restrito quando comparada a outras técnicas de aplicação de produtos químicos (MORAES, 2004).

Além de controlar patógenos importantes transmitidos pela semente, o tratamento de sementes é uma prática eficiente para assegurar populações adequadas de plantas, quando as condições edafoclimáticas durante a semeadura são desfavoráveis à germinação e à rápida emergência da cultivar, deixando a semente exposta por mais tempo a fungos habitantes do solo como *Rhizoctonia solani*, *M. phaseolina*, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. que, entre outros, podem causar a sua deterioração no solo ou a morte de plântulas (HENNING, 2004).

Apesar da comprovada eficiência dos produtos químicos, a agricultura moderna tem buscado formas alternativas para o tratamento de sementes e o manejo de doenças, que, de um modo geral, resultem em maior preservação ambiental e produtos de melhor qualidade para os consumidores. Nesse contexto, o emprego de substâncias naturais com ação fungicida, tais como extratos e óleos vegetais, e de microrganismos antagonistas de fitopatógenos, como espécies de *Trichoderma* e de *Bacillus*, surge como uma opção de baixo impacto ecológico e ambiental.

Os óleos essenciais são considerados misturas complexas de substâncias voláteis, com baixa massa molecular, líquidas, lipofílicas e odoríferas em sua maior parte. São extraídos de várias partes vegetais, através de arraste a vapor d'água, expressão de pericarpo ou hidrodestilação. Possuem característica volátil e aspecto oleoso em temperatura ambiente (MORAIS, 2009). Essas substâncias, junto com os extratos vegetais, vêm apresentando uma grande popularidade e interesse científico, pois são fonte potencial de produtos antimicrobianos de origem natural. Os principais constituintes de óleos essenciais são mono- e sesquiterpenos, incluindo hidratos de carbono, fenóis, alcoóis, éteres, aldeídos e cetonas, responsáveis pela atividade biológica e por sua fragrância. Compostos fenólicos presentes em óleos essenciais também têm sido reconhecidos como componentes bioativos antimicrobianos (NUZHAT; VIDYASAGAR, 2013).

Em geral, os óleos essenciais e extratos derivados de plantas são considerados compostos não-fitotóxicos, potencialmente eficazes contra vários microrganismos, incluindo os fungos fitopatogênicos. O potencial de controle destes fitopatógenos por estas substâncias se deve a sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005), ou

através da indução de fitoalexinas, que contêm propriedades elicitoras (ROZWALKA et al., 2008). Também já foi constatado que os óleos essenciais, em contato com microrganismos, podem provocar danos à membrana celular, interferindo na permeabilidade e causando a vazão de seus constituintes (BARD et al., 1988; COX et al., 2000; PIPER et al., 2001).

Embora a ação de óleos essenciais sobre fitopatógenos venha sendo cada vez mais pesquisada, muitos estudos restringem-se à investigação do efeito *in vitro* de tais substâncias, normalmente sobre o crescimento micelial e, eventualmente, sobre a esporulação, de fungos fitopatogênicos. No tocante ao tratamento de sementes com óleos essenciais, as pesquisas são escassas, embora o efeito positivo deste já tenha sido constatado.

Nguefack et al. (2008) relataram que três óleos essenciais, extraídos a partir de *Cymbopogon citratos*, *Ocimum gratissimum*, e *Thymus vulgaris*, são capazes de controlar a infecção de patógenos associados a sementes. Os três óleos essenciais aplicados controlaram a infecção das sementes com uma eficácia variando de 48% a 100%.

Kordali et al. (2008) determinaram as propriedades antifúngica, fitotóxica e inseticida do óleo essencial isolado de *Origanum acutidens* e de seus três componentes majoritários, o carvacrol, o timol e o p-cimeno. Os estudos mostraram que o óleo essencial de *O. acutidens* e os componentes carvacrol e timol inibiram completamente o crescimento micelial de dezessete fungos fitopatogênicos, sendo seus efeitos antifúngicos maiores do que o fungicida comercial empregado. No entanto, o p-cimeno apresentou atividade antifúngica inferior. Os autores também observaram total inibição da germinação das sementes e do crescimento de plântulas de *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* e *Rumex crispus* devido ao óleo, carvacrol e timol, além de forte efeito fitotóxico contra estas plantas; já o p-cimeno não mostrou qualquer efeito fitotóxico. Tais resultados reforçam a necessidade de estudos detalhados para se estabelecer um tratamento que permita o manejo dos patógenos nas sementes sem prejudicar o potencial fisiológico destas.

Araujo Neto et al. (2012) observaram que o tratamento das sementes de erva doce com óleo de anis (concentrações variando de 1,0% a 2,5%) promoveu 100% de controle do fungo *Cladosporium* sp. em todas as concentrações testadas e redução crescente de *Alternaria* sp. com o aumento das concentrações do óleo.

Resultados semelhantes com o emprego do óleo de anis em tratamento de sementes também haviam sido observados por Medeiros et al. (2011) e Leite et al. (2011), que constaram erradicação da micoflora das sementes tratadas de flamboyant mirim e sabiá, respectivamente.

Outra alternativa ao tratamento com uso de produtos químicos sintéticos é tratamento biológico de sementes, também conhecido como microbiolização de sementes, que consiste na aplicação de microrganismos vivos às mesmas, com o intuito de controlar fitopatógenos (SANTOS, 2014). Segundo Harman (2000), a microbiolização das sementes também promove benefícios referentes à germinação, emergência e desenvolvimento das plântulas. O tratamento microbiológico de sementes vem sendo utilizado com objetivo de controlar patógenos causadores de podridões das sementes, tombamento, podridões radiculares e morte das plântulas, e pode visar também ao controle de patógenos foliares, que têm as sementes como fonte de inóculo (SANTOS, 2014).

O controle biológico possui alta especificidade contra fitopatógenos, é de baixo custo, além de não causar danos ao meio ambiente. Os mecanismos de ação dos agentes antagônicos são morte direta do patógeno, através do parasitismo, competição espacial e alimentar, e efeitos tóxicos sobre o patógeno, devido à produção de antibióticos pelo antagonista (WHIPPS, 2001; HEYDARI; PESSARAKLI, 2010).

Tratamentos químicos de sementes com fungicidas sintéticos podem ser substituídos por tratamentos biológicos, trazendo benefícios econômico, social e ambiental. O controle biológico com antagonistas como *Trichoderma* pode reduzir o número de aplicações dos produtos químicos sintéticos e, eventualmente, eliminar essa prática, dependendo das condições ambientais, severidade e manejo da doença (CALVO et al., 2007; POMELLA; RIBEIRO, 2009; HEYDARI; PESSARAKLI, 2010). Alguns isolados também podem estimular o crescimento das plantas (HARMAN et al., 2004; VINALE et al., 2008) devido à colonização da rizosfera (competência rizosférica), produção de substâncias que estimulam o crescimento das plantas e solubilização de nutrientes perto das raízes, permitindo que essas substâncias sejam assimiladas pela planta (HARMAN, 2000).

Bactérias da rizosfera também são excelentes agentes para controlar patógenos de plantas. A ação de espécies bacterianas de gêneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Arthrobacter* já foi comprovada em termos de controle de doenças fúngicas (JOSEPH et al., 2007; ONGENA; JACQUES, 2008; CHOUDHARY; JOHRI, 2009; HOBLEY et al., 2013). Relatos prévios demonstraram que os microrganismos capazes de lisar quitina, um dos principais constituintes da parede celular fúngica, desempenham um papel importante no controle biológico de patógenos fúngicos (YU et al., 2002; ZHANG; FERNANDO, 2004; ABDULLAH et al., 2008). Fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias como *Bacillus*, *Serratia* e *Alteromonas* foram relatados como tendo atividade quitinolítica (MABUCHI et al., 2000; SOMEYA et al., 2001; VITERBO et al., 2001; WEN et al., 2002; HUANG et al., 2005). Espécies não-patogênicas de *Bacillus* presentes no solo oferecem várias vantagens sobre outros organismos, pois, como formam endósporos, podem tolerar condições adversas de pH, temperatura e condições osmóticas. Algumas espécies de *Bacillus* colonizam a superfície das raízes, proporcionando aumento no crescimento das plantas e causando a lise de micélio fúngico (TAKAYANAGI et al., 1991; TURNER; BACKMAN, 1991; PODILE; PRAKASH, 1996).

A ação supressora de *Bacillus subtilis* já foi constatada sobre diferentes gêneros de fitopatógenos, como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Verticillium*, *Sclerotinia* e *Septoria* (NAGORSKA et al., 2007; ONGENA; JACQUES, 2008). A utilização de antagonistas também é eficiente para o controle de damping-off. *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas fluorescens* e *B. subtilis* são espécies microbianas que demonstraram capacidade de controlar *Rhizoctonia solani*, um dos patógenos causadores de damping-off (CAVAGLIERI et al., 2005).

Com relação ao tratamento de sementes com produtos biológicos, embora os estudos ainda sejam escassos, alguns resultados têm demonstrado a eficiência desta prática no controle de fitopatógenos.

Singh et al. (2008) investigaram a ação de *B. subtilis* BN1 sobre *M. phaseolina* e constataram inibição do crescimento micelial deste fungo, *in vitro*, e acréscimo na biomassa e redução nos sintomas de podridão radicular em plântulas de *Pinus roxburghii*, em casa de vegetação.

Dawar et al. (2010) avaliaram o potencial de biocontrole de fungos radiculares, patogênicos ao caupi e feijoeiro, por *B. subtilis*, *B. thuringiensis* e *B. cereus*, *in vitro* e *in vivo*. As três espécies inibiram o crescimento de *Fusarium* spp. *in vitro*, com a máxima inibição proporcionada por *B. thuringiensis*. Para *M. phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, *B. subtilis* foi a espécie responsável pelas maiores zonas de inibição. O emprego das três espécies, em tratamento das sementes ou encharcamento do solo, resultou em aumento de comprimento e peso de raízes e parte aérea das plântulas.

Carvalho et al. (2011b) estudaram o efeito do tratamento de sementes de feijoeiro comum “Jalo Precoce” com *T. harzianum* e constataram a redução na incidência dos fungos *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Sclerotinia*.

Akrami et al. (2012) verificaram redução na colonização de feijoeiros por *Fusarium solani*, com o tratamento das sementes com *T. harzianum* e *T. asperellum*, aplicados isolados ou em mistura, em suspensão aquosa ou em solução açucarada de conídios.

Ashwini e Srividya (2014) estudaram a ação de *B. subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1, causador da antracnose da pimenteira, e verificaram que a bactéria inibiu o crescimento do fungo *in vitro* e que o tratamento das sementes com *Bacillus* promoveu uma redução na incidência da doença; segundo estes autores, foi demonstrada a ação quitinolítica da bactéria sobre este fungo.

Ferrigo et al. (2014) avaliaram o efeito do tratamento de sementes com o isolado T22 de *T. harzianum* sobre a colonização de espigas de milho por *F. verticillioides* e sobre a produção da micotoxina fumosinina, em condições de campo. Os autores observaram, em três anos de pesquisa, uma redução média de 58% e 53% na infestação fúngica e na contaminação com a micotoxina, respectivamente, com o emprego do tratamento biológico das sementes.

Além do aspecto fitossanitário, já foi constatado o efeito positivo da microbiolização de sementes, principalmente com *Trichoderma* spp., na germinação das sementes tratadas e na emergência, crescimento e vigor de plantas oriundas destas (JEGATHAMBIGAI et al., 2009; ASADUZZAMAN et al., 2010; CARVALHO et al., 2011b; KAVEH et al., 2011; PAL et al., 2013; XUE et al., 2017). Mastouri et al. (2010) avaliaram o efeito do tratamento de sementes com *T. harzianum* T22 sobre a

germinação de sementes de tomate cv. Jubilee expostas a estresses bióticos (doença causada por *Pythium ultimum*) e abióticos (condição osmótica, salinidade e temperaturas frias ou quentes excessivas), e desenvolvimento das plântulas, e verificaram que o tratamento das sementes tinha pouco efeito na performance de sementes não expostas aos estresses, porém, sob estresse abiótico, as sementes tratadas germinaram mais rápido e de maneira mais uniforme que as não tratadas.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do tratamento de sementes de feijão com óleos essenciais e antagonistas sobre a incidência de *Macrophomina phaseolina* e o potencial fisiológico das sementes tratadas.

CAPÍTULO 1 - Tratamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com óleos essenciais para o manejo de *Macrophomia phaseolina* (Tassi) Goid.

RESUMO

Buscando uma forma alternativa de controlar *Macrophomia phaseolina* em sementes de feijão, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com óleos essenciais sobre a incidência do fungo e suas implicações na qualidade fisiológica das sementes tratadas. Na primeira etapa, foi testado o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de cravo-da-índia, pimenta-preta e gerânio, nas concentrações 0,25%, 0,50% e 0,75%, sobre o crescimento micelial e a esporulação do fungo. Os óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta-preta promoveram 100% de inibição no crescimento fúngico, não possibilitando a esporulação deste. O óleo essencial de gerânio não proporcionou resultados satisfatórios, permitindo uma alta produção de esporos. Em seguida, sementes infectadas por *M. phaseolina* foram tratadas com os óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta-preta e avaliadas quanto à incidência do patógeno e à germinação e vigor. Os resultados obtidos revelaram o potencial antifúngico dos óleos essenciais no tratamento de sementes, tendo sido o de pimenta-preta o mais consistente no controle de *M. phaseolina*, sem interferir na qualidade fisiológica das sementes tratadas.

Palavras-chave: Podridão cinzenta da haste, controle alternativo, patologia de sementes, fungicida natural, germinação, vigor

ABSTRACT

Searching an alternative way of controlling *Macrophomia phaseolina* in bean seeds, the present work was carried out aiming at evaluating the effect of the treatment with essential oils on this fungus incidence and its implications on the seeds physiological quality. In the first stage, the *in vitro* effect of clove, black pepper and geranium essential oils at concentrations of 0.25%, 0.50% and 0.75% on the fungus mycelial growth and sporulation was tested. Clove and black pepper essential oils promoted 100% inhibition in the fungical growth, not allowing its sporulation. Geranium essential oil did not provide satisfactory results, allowing a high spore production.

Then, seeds infected with *M. phaseolina* were treated with clove and black pepper essential oils and evaluated for the pathogen incidence, germination and vigor. The results obtained revealed these essential oils antifungal potential for seeds treatment, being the black pepper one the most consistent in *M. phaseolina* control, with no interference in the physiological quality of the treated seeds.

Keywords: Charcoal rot of common bean, alternative control, seed pathology, natural fungicide, germination, vigour

1.1 Introdução

A incidência de patógenos na cultura do feijoeiro comum causa perdas na qualidade fisiológica de sementes e desuniformidade na germinação, interferindo no estabelecimento do estande inicial (1). Além disso, as sementes são importantes veículos para a introdução e disseminação de patógenos em regiões onde estes ainda não ocorrem. Dentre os vários patógenos de importância epidemiológica que podem comprometer a produção e a qualidade das sementes de feijão, está o fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., causador da podridão cinzenta da haste do feijoeiro, considerado um dos mais importantes e destrutivos patógenos necrotróficos habitantes de solos (2).

O tratamento de sementes pode ser entendido como qualquer operação que envolva as sementes, pelo manejo através da incorporação de produtos químicos ou biológicos, e/ou pela utilização de agentes físicos, visando à melhoria ou garantia do seu desempenho em condições de cultivo. Especificamente para o controle de patógenos, o tratamento de sementes pode ser praticado, utilizando-se métodos químicos, físicos, biológicos ou a combinação destes (3). Esta prática tem baixo custo e seu efeito sobre o ambiente é bastante restrito quando comparada a outras técnicas de aplicação de produtos químicos (4).

Apesar da comprovada eficiência dos produtos químicos sintéticos no controle de doenças de plantas, novas medidas de proteção de plantas contra doenças têm sido pesquisadas, com intuito de minimizar os efeitos negativos do uso de produtos químicos e aumentar a produção de alimentos de melhor qualidade, propiciando, assim, o desenvolvimento de uma agricultura alternativa e/ou sustentável (5). Nesse contexto, o emprego de substâncias naturais com ação fungicida, tais como extratos

e óleos vegetais, e de microrganismos antagonistas de fitopatógenos surge como uma opção de baixo impacto ecológico e ambiental.

Os óleos essenciais são considerados misturas complexas de substâncias voláteis, com baixa massa molecular, líquidas, lipofílicas e odoríferas em sua maior parte. São extraídos de várias partes vegetais, através de arraste a vapor d'água, expressão de pericarpo ou hidrodestilação. Possuem característica volátil e aspecto oleoso em temperatura ambiente (6). Essas substâncias, junto com os extratos vegetais, vêm apresentando uma grande popularidade e interesse científico, pois são fonte potencial de produtos antimicrobianos de origem natural. Os principais constituintes de óleos essenciais são mono- e sesquiterpenos, incluindo hidratos de carbono, fenóis, alcoóis, éteres, aldeídos e cetonas, responsáveis pela atividade biológica e por sua fragrância. Compostos fenólicos, monoterpenos e terpenoides presentes em óleos essenciais também têm sido reconhecidos como componentes bioativos antimicrobianos (7, 8).

Em geral, os óleos essenciais e extratos derivados de plantas são considerados compostos não-fitotóxicos, potencialmente eficazes contra vários microrganismos, incluindo os fungos fitopatogênicos. O potencial de controle destes fitopatógenos por estas substâncias se deve a sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos (9), ou através da indução de fitoalexinas, que contêm propriedades elicitoras (10). Também já foi constatado que os óleos essenciais, em contato com microrganismos, podem provocar danos à membrana celular, interferindo na permeabilidade e causando a vazão de seus constituintes (11-14). Os óleos essenciais e seus constituintes podem atuar de maneiras diferentes de acordo com a concentração utilizada, de modo que, o mesmo óleo essencial pode atuar sobre uma ampla gama de microrganismos, mas as concentrações mínimas inibitórias podem variar (15).

Embora a ação de óleos essenciais sobre fitopatógenos venha sendo cada vez mais pesquisada, muitos estudos restringem-se à investigação do efeito *in vitro* de tais substâncias, normalmente sobre o crescimento micelial e, eventualmente, sobre a esporulação, de fungos fitopatogênicos. No tocante ao tratamento de sementes com óleos essenciais, as pesquisas são escassas, embora o efeito positivo deste já tenha sido constatado (16-20)

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento de sementes de feijão com óleos essenciais sobre a incidência de *M. phaseolina* e suas implicações na qualidade fisiológica das sementes tratadas.

1.2 Material e métodos

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Câmpus de Botucatu, SP. O ensaio constou de duas etapas, sendo inicialmente avaliado o efeito *in vitro* dos óleos essenciais sobre *M. phaseolina*. Na segunda etapa, os óleos essenciais foram empregados no tratamento de sementes de feijoeiro, cultivar BRS-Estilo, sendo avaliadas a incidência do fungo nas sementes tratadas e as implicações deste tratamento na qualidade fisiológica destas.

Os óleos essenciais testados foram os de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), pimenta-preta (*Piper nigrum*) e gerânio (*Pelargonium graveolens*), adquiridos na empresa Destilaria Bauru. Segundo análise química realizada pelo fornecedor, os principais componentes majoritários dos óleos essenciais foram eugenol (81,0%), limoneno (19,15%) e citronelol (27,0%), respectivamente para cravo-da-índia, pimenta-preta e gerânio.

Obtenção do isolado de *M. phaseolina*. O fungo foi isolado de amostra de solo coletada em área da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil, sendo cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), em incubadoras do tipo BOD, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento, o fungo foi repicado para novas placas de Petri contendo meio BDA e incubado nas mesmas condições, para obtenção de colônias puras. O fungo foi inoculado em sementes de feijão (BRS-Estilo), após o surgimento de microescleródios, foi novamente isolado e incubado nas mesmas condições, sendo preservado em água destilada esterilizada (Castellani, 1939) para a utilização em todo o experimento. Os isolados estão depositados na Micoteca "Mário Barreto Figueiredo", Instituto Biológico, São Paulo, SP, sob os números MMBF 11/18 (Botucatu, SP) e MMBF 12/18 (Maringá -PR).

Efeito in vitro de óleos essenciais no desenvolvimento de M. phaseolina

O experimento foi realizado em duplicata (Ensaio 1 e 2), no delineamento inteiramente casualizado, segundo o esquema fatorial 3 x 3 (três óleos essenciais x três concentrações) e duas testemunhas, com 4 repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição. Os óleos essenciais de cravo-da-índia, pimenta-preta e gerânio foram adicionados ao meio de cultura BDA no momento deste ser vertido em placas de Petri. As concentrações utilizadas foram 0,25%, 0,50% e 0,75%, sendo estabelecidas através de testes preliminares. Os tratamentos controle incluídos nos ensaios foram meio BDA puro e meio BDA acrescido de fungicida à base de tiofanato metílico + fluazinam (750 ppm, concentração determinada por testes preliminares). Após a solidificação do meio, discos de 0,5 cm de diâmetro contendo o fungo foram transferidos para as placas de Petri contendo os tratamentos. As placas foram acondicionadas em câmaras tipo BOD, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente. Foram avaliados o crescimento micelial e a esporulação fúngica. O crescimento micelial foi acompanhado diariamente e avaliado até a primeira colônia fúngica atingir as bordas da placa de Petri (representando o crescimento máximo), medindo-se o diâmetro das colônias (cm), com o auxílio de um paquímetro digital, em todos os tratamentos, em duas posições perpendiculares entre si, considerando-se o valor médio dessas medidas. Para a avaliação da esporulação, foram retirados discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro, em três posições do raio de crescimento da colônia fúngica, e transferidos para recipientes plásticos contendo 5 mL de água destilada com espalhante adesivo Tween 80 (uma gota em 100 mL de água). Estes recipientes foram agitados durante três minutos, obtendo-se, assim, a suspensão de conídios para a leitura da esporulação. A concentração de esporos (número de esporos/mL) foi determinada através de leitura em hemocitômetro, sendo realizadas quatro leituras por repetição, considerando-se o valor médio destas. Para a análise estatística, os dados de esporulação foram transformados para log x. Os resultados das duas variáveis foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias das testemunhas e do fatorial, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cada tratamento foi comparado a cada testemunha pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade (21)

Tratamento de sementes de feijoeiro infectadas por M. phaseolina com óleos essenciais. Efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes.

Para a obtenção de sementes infectadas por *M. phaseolina*, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após sete dias de incubação a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados da periferia da colônia fúngica e transferidos para placas de Petri contendo BDA acrescido de manitol, no potencial hídrico de -1,0 MPa (73,77g/L). A concentração do manitol foi determinada pela fórmula de Van't Hoff (22). Sementes da cultivar BRS-Estilo, previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% por um minuto, foram depositadas em camada única, sobre a colônia fúngica, permanecendo em contato com o patógeno por 24 horas. Outra porção de sementes foi submetida às mesmas condições, porém sem a presença do inóculo no meio. Após a inoculação, as sementes passaram novamente pela desinfestação superficial e foram secas. As sementes (inoculadas e sadias) foram misturadas, de modo a se obter um lote de trabalho com 20% de infecção.

Para o tratamento das sementes, os óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta-preta foram misturados, individualmente, em água destilada esterilizada, contendo Tween 80 (1,0mL/L). O óleo essencial de gerânio não foi testado em função do desempenho insatisfatório apresentado nos ensaios *in vitro*. Foram adotadas as mesmas concentrações do experimento *in vitro*: 0,25%, 0,50% e 0,75%. As sementes foram imersas na solução por cinco minutos e, em seguida, dispostas sobre papel toalha por 24 horas para secar. Foram também avaliados os seguintes tratamentos: sementes tratadas com o fungicida tiofanato metílico + fluazinam (imersão em solução à concentração de 750ppm); sementes inoculadas e sementes não inoculadas, ambas imersas apenas em água destilada + Tween 80, por cinco minutos.

Avaliação sanitária das sementes

A avaliação da incidência de *M. phaseolina* nas sementes foi realizada pelo método do papel de filtro (blotter test) (23). Em cada placa descartável (9,0cm de diâmetro), foram depositadas três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada, e distribuídas dez sementes equidistantes. As sementes foram incubadas à temperatura de 20±2°C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente, e

examinadas, individualmente, sob microscópio estereoscópico (lupa), para a detecção do fungo, após sete dias de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com *M. phaseolina*. O experimento foi realizado em duplicata (Ensaio 1 e 2), no delineamento experimental inteiramente casualizado, com nove tratamentos e vinte repetições, sendo a parcela experimental constituída por uma placa de Petri com dez sementes de feijão. Os dados, transformados em $\text{arc sen } \sqrt{(x/100)}$ foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (21).

Avaliação do potencial fisiológico das sementes

O efeito do tratamento das sementes com os óleos essenciais sobre o potencial fisiológico destas foi avaliado através do teste de germinação e dos seguintes testes de vigor: primeira contagem de germinação e índice de velocidade de emergência, conforme descrito a seguir.

a) Germinação e primeira contagem de germinação (PCG): Os testes, realizados concomitantemente, foram realizados de acordo com a técnica do rolo de papel (RP), tendo-se o papel de germinação como substrato. Foram empregadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. O papel de germinação foi pré-umedecido com quantidade de água desionizada equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas e sobrepostas com uma terceira folha, embrulhadas em forma de rolo. Os rolos foram mantidos, no germinador, na posição vertical, a 25°C. As avaliações foram realizadas aos cinco (primeira contagem de germinação) e aos nove (germinação) dias após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais para cada tratamento (23, 24).

b) Índice de velocidade de emergência (IVE): o teste foi conduzido em casa de vegetação em vasos contendo areia esterilizada, com dez repetições de três sementes por tratamento. Foi computado o número de plântulas normais emergidas até a estabilização da emergência, quando se fez a última leitura do IVE, sendo os resultados expressos em porcentagem. Com base no número de plântulas emergidas, foi calculado o IVE, empregando-se a seguinte fórmula:

$$\text{IVE} = \frac{E_1 + E_2 + \dots + E_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Onde: $N_1, N_2, \dots, N_n = n^\circ$ de dias decorridos da semeadura até a primeira, segunda, ..., última contagem. $E_1, E_2, \dots, E_n = n^\circ$ de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem (23).

O delineamento experimental empregado nos ensaios de potencial fisiológico das sementes foi o inteiramente casualizado, com as repetições especificadas em cada teste, conforme descrito anteriormente. Resultados expressos em porcentagem foram transformados $\arcsen \sqrt{(x/100)}$. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (21).

1.3 Resultados e discussão

Efeito in vitro de óleos essenciais no desenvolvimento de M. phaseolina

A análise estatística revelou haver interação significativa entre óleos essenciais e concentrações, para o crescimento micelial e para a esporulação do fungo, em ambos os ensaios. Os resultados do desdobramento das interações podem ser observados na Tabela 1.

Com relação ao crescimento micelial, analisando-se cada óleo essencial separadamente, pode-se observar que só houve diferença entre as concentrações para o óleo de gerânio, tendo a concentração 0,75% proporcionado a maior inibição no crescimento fúngico, nos dois ensaios. Os tratamentos com este óleo essencial não diferiram da testemunha (BDA) e do tratamento com fungicida. Os óleos essenciais de cravo-da-índia e de pimenta-preta inibiram em 100% o desenvolvimento fúngico, em todas as concentrações, em ambos os ensaios, diferindo da testemunha e não diferindo do fungicida. Considerando-se cada concentração, os óleos essenciais de cravo-da-índia e de pimenta-preta não diferiram entre si e diferiram do óleo essencial de gerânio.

Quanto à esporulação, verificou-se que o óleo essencial de gerânio, apesar de ter proporcionado certa redução no crescimento micelial, possibilitou grande produção de esporos, o que é indesejável, por representar alto potencial de inóculo. Observou-se que a esporulação foi reduzida de acordo com o aumento da concentração.

A ação dos óleos essenciais sobre *M. phaseolina* observada nos ensaios *in vitro* do presente trabalho corrobora alguns resultados anteriormente obtidos em estudos com este fungo. A pesquisa conduzida por Martins et al. (25) revelou que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, em diferentes concentrações (0,0%, 0,2%, 0,4%, 0,6% e 0,8%), proporcionou redução significativa no crescimento micelial *in vitro* de *M. phaseolina*, *Alternaria alternata* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta redução foi proporcional ao aumento da concentração do óleo essencial, o que também foi observado na presente pesquisa para o óleo essencial de gerânio. Assim como ocorreu para os óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta preta, que tiveram desempenho semelhante ao fungicida empregado, Kazmi et al. (26) constataram que o óleo de nim possuía maior ou igual eficiência quando comparado a fungicidas sintéticos como benomil e carbendazim na inibição do desenvolvimento *in vitro* de *M. phaseolina*.

A ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia vem sendo bastante estudada. Costa et al. (27) estudou o efeito deste óleo essencial sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* e *M. phaseolina*, verificando que na concentração 0,15% houve total inibição do desenvolvimento das três primeiras espécies fúngicas, porém permitindo o crescimento de *M. phaseolina*. A ação antifúngica do óleo essencial de cravo se deve ao eugenol, seu composto majoritário (28, 29), que interfere na membrana celular, danificando-a (27, 30). O efeito inibitório obtido nos ensaios deste estudo pode estar associado à alta concentração de eugenol (81%) presente no óleo essencial de cravo-da-índia utilizado.

O óleo essencial de pimenta-preta mostrou o mesmo desempenho do óleo essencial de cravo-da-índia, inibindo totalmente o crescimento e a esporulação de *M. phaseolina*. A ação inibitória do óleo essencial extraído de espécies da família Piperaceae também tem sido comprovada. Os resultados obtidos neste trabalho concordam com os observados no estudo de Bastos e Albuquerque (31) que observaram 100% de inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios de *Colletotrichum musae*, com o óleo essencial de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*) nas concentrações acima de 100 µg/ml.

Não há referências do emprego do óleo essencial de gerânio para o manejo de fitopatógenos. Apesar deste óleo essencial ter proporcionado certa inibição no

crescimento micelial, os resultados obtidos não foram satisfatórios, possibilitando alta produção de esporos. Desta maneira, apenas os óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta-preta foram empregados no tratamento de sementes para os estudos *in vivo*.

Tratamento de sementes de feijoeiro infectadas por M. phaseolina com óleos essenciais. Efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes.

A análise sanitária, nos dois ensaios, revelou que as sementes não inoculadas estavam isentas de *M. phaseolina* (Tabela 2). Houve alta incidência do fungo nas sementes inoculadas que não foram tratadas, em ambos os ensaios. Todos os tratamentos com óleos essenciais e o tratamento com fungicida proporcionaram redução na incidência de *M. phaseolina*, diferindo daquela observada nas sementes inoculadas não tratadas. No ensaio 1, os tratamentos com óleos essenciais não diferiram do tratamento com fungicida, porém, verificou-se que a incidência fúngica nas sementes foi numericamente menor nos tratamentos com o óleo essencial de cravo-da-índia. No ensaio 2, o óleo essencial de cravo-da-índia controlou totalmente o patógeno, não diferindo do fungicida e das sementes não inoculadas. Já para o óleo de pimenta preta, apenas a concentração de 0,75% resultou no mesmo desempenho observado no ensaio 1.

Embora se conheça a ação antimicrobiana de vários óleos essenciais sobre fitopatógenos, as pesquisas com o emprego destes ainda são escassas e normalmente não direcionadas a patógenos considerados habitantes do solo. O sucesso do tratamento de sementes com óleos essenciais foi comprovado por Montes-Belmont e Carvajal (32), que verificaram o controle total de *Aspergillus flavus* em grãos de milho, com o óleo essencial de cravo-da-índia e outros, e apenas redução da incidência deste fungo com o tratamento com óleo essencial de pimenta-preta e eucalipto (*Eucalyptus globulus*), comportamento semelhante aos que foram observados no presente estudo.

A eficiência do tratamento com óleos essenciais varia de acordo com os óleos essenciais empregados, a composição destes, a microflora presente nas sementes e as condições de ambiente. Apesar das pesquisas serem restritas, a prática tem se mostrado bem sucedida (16-20).

Para o tratamento de sementes com os óleos essenciais ser considerado uma técnica viável, estes devem controlar os fitopatógenos em estudo, sem prejudicar a qualidade fisiológica das sementes tratadas.

A presença do fungo nas sementes não interferiu na germinação destas, não sendo constatada diferença significativa entre a germinação das sementes inoculadas e as não inoculadas, nos dois ensaios (Tabela 3). O tratamento com o óleo essencial de pimenta-preta possibilitou germinação semelhante àquela obtida com o tratamento fungicida. Já o óleo essencial de cravo-da-índia, com exceção da concentração de 0,25% no ensaio 1, interferiu negativamente na germinação, diferindo dos demais tratamentos e resultando em menor germinação. Resultados semelhantes foram obtidos no teste de vigor primeira contagem de germinação. Com relação ao índice de velocidade de emergência, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, exceto entre o óleo essencial de cravo-da-índia a 0,25% e o fungicida, no ensaio 1, revelando que os óleos essenciais, em geral, não interferiram no vigor das sementes. Os resultados obtidos para o óleo essencial de cravo-da-índia concordam com os obtidos por Gonçalves et al. (33), que verificaram ausência de *M. phaseolina* em sementes de feijão tratadas com extrato de cravo-da-índia a 10% e com o fungicida captan. Há que se ressaltar que, por serem mais concentrados, os óleos essenciais são utilizados em concentrações menores que os extratos vegetais. Estes autores também verificaram que, apesar do efeito positivo no controle do fungo, o emprego do extrato de cravo-da-índia a 10% causou redução na germinação das sementes. Com relação ao óleo essencial de pimenta preta, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os de Lobato et al. (34), que avaliaram o potencial do óleo essencial de pimenta-de-macaco, outra Piperaceae, no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata*, verificando a redução de fitopatógenos, entre eles *Macrophomina phaseolina*, sem interferir na germinação das sementes.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram o potencial antifúngico dos óleos essenciais de cravo-da-índia e de pimenta preta, tendo sido este último mais consistente no controle de *M. phaseolina*, sem interferir na qualidade fisiológica das sementes tratadas.

Referências

- 1 CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. de; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.36-42, 2011.
- 2 GUPTA, G.K.; SHARMA, S.K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v.160, p.167–180, 2012.
- 3 ZAMBOLIM, L. Importância do tratamento de sementes no manejo integrado de doenças. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa, PB. **Palestras e Resumos...**, João Pessoa: Tropical Hotel Tambaú, 2004. p.94-94.
- 4 MORAES, M.H.D. Análise de sementes tratadas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa, PB. **Palestras e Resumos...**, João Pessoa: Tropical Hotel Tambaú, 2004. p.99.
- 5 POPIA, A.F.; CIDADE JUNIOR, H.A.; HAMMERSCHMIDT, I.; TOLEDO, M.V.; ASSIS, O. **Manual de Olericultura Orgânica**. Curitiba: Emater/Seab. 2007. 128p.
- 6 MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.27, p.4050-4063, 2009.
- 7 GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**. v.119, p.731-737, 2010.
- 8 NUZHAT, T.; VIDYASAGAR, G.M. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, Suppl.2, p.19-28, 2013.
- 9 SCHAWN-ESTRADA, K.R.F; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMERO, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. P.125-138.
- 10 ROZWALKA, L.C.; LIMA, M.L.R.Z.C.; MIO, L.L.M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.301-307, 2008.
- 11 BARD, M.; ALBRECHT, M.; GUPTA, N.; GUYNN, C.J.; STILLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v.23, p.534-538, 1988.

- 12 COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.
- 13 PIPER, P.; CALDERON, C. O.; HATZIXANTHIS, K.; MOLLAPOUR, M. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, v.147, p.2635-2642, 2001.
- 14 OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; PICCOLI, R.H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de Cymbopogon. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.8-16, 2011.
- 15 ANTUNES, M.D.C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**. v.25, p.351-366, 2010.
- 16 NGUEFACK, J.; LETH, V.; LEKAGNE DONGMO, J.B.; TORP, J.; AMVAM ZOLLO, P.H.; NYASSE, S. Use of three essential oils as seed treatments against seed-born fungi of rice (*Oryza sativa* L.). **American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science**, v.4, p.554-560, 2008.
- 17 KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v.99, p.8788-8795, 2008.
- 18 MEDEIROS, J.G.F.; LEITE, R.P.; NASCIMENTO, L.C. Extratos vegetais e seus efeitos na sanidade e fisiologia de sementes de flamboyant-mirim (*Caesalpinia pulcherrima* L.). In: SEABRA, G.; MENDONÇA, I. (Eds.). **Educação ambiental: Responsabilidade para a conservação da sociobiodiversidade**. João Pessoa: Editora Universitária, 2011. p.373-377.
- 19 LEITE, R.P.; MEDEIROS, J.G.F.; NASCIMENTO, L. C. Produtos naturais e seus efeitos sobre a micoflora e fisiologia em sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). In: SEABRA, G.; MENDONÇA, I. (Eds.). **Educação ambiental: Responsabilidade para a conservação da sociobiodiversidade**. João Pessoa: Editora Universitária, 2011. p.559-564.
- 20 ARAUJO NETO, A.C.A.; ARAUJO, P.C.; SOUZA, W.C.O.; MEDEIRO, J.G.F.; AGUIAR, A.V.M. Óleo essencial de anis na incidência e controle de patógenos em sementes de erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Revista Verde**, v.7, n.1, p.170-176, 2012.
- 21 BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N.K. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 237p.

- 22 SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4 ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.
- 23 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária: Brasília, 2009. 395p.
- 24 NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Abrates: Londrina, 1999. cap. 2, p.1-24.
- 25 MARTINS, J.A.S.; SAGATA, E.; SANTOS, V.A., JULIATTI, F.C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, v.27, n.1, p.49-51, 2010.
- 26 KAZMI, S., SALEEM, S., ISHRAT, N., SHAHZAD, S. AND NIAZ, I. (1995) Effect of neem oil in vitro growth of the root infecting fungi. **Pakistan Journal of Botany** 27, 217–220.
- 27 COSTA, A.R.T.; AMARAL, M.F.Z.J.; MARTINS, P.M.; PAULA, J.A.M.; FIUZA, T.S.; RESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.2, p. 240-245, 2011.
- 28 WANG, C.; ZHANG, J.; CHEN, H.; FAN, Y.; SHI, Z. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 137-143, 2010.
- 29 RANA, I. S. et al. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1269-1277, 2011.
- 30 GILL A.O., HOLLEY R.A. Inhibition of membrane bound ATPase of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.170-174, 2006.
- 31 BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de Piper aduncum no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia brasileira**, v.29, n.5, p.555- 557, 2004.
- 32 MONTES-BELMONT. R. CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in Maize with Plant Essential Oils and Their Components R. **Journal of Food Protection**, v.61, n.5, p.616-619, 1998,
- 33 GONÇALVES, E. P; ARAÚJO, E ; ALVES, E. U ; COSTA. N, P. Tratamento químico e natural sobre a qualidade fisiológica e sanitária em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas. **Revista Biociências**, v.9, n.1, p.23-29, 2003.

- 34 LOBATO, A.K.S.; SANTOS, D.G.C.; OLIVEIRA, F.C.; GOUVEA, D.D.S.; TORRES, G.I.O.S.; LIMA-JUNIOR, J.A.; OLVEIRA-NETO, C.F.; SILVA, M.H.L. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. Utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p. 915-917. 2007.

Tabela 1. Crescimento micelial e esporulação do fungo *Macrophomina phaseolina*, cultivado em meio de cultura BDA, BDA acrescido do fungicida tiofanato metílico + fluazinam e BDA acrescido de óleos essenciais (OE) em diferentes concentrações.

Tratamentos		Ensaio 1			Ensaio 2		
		Crescimento micelial (cm)	Esporulação		Crescimento micelial (cm)	Esporulação	
			log (x+1)	Nº esporos/mL		log (x+1)	Nº esporos/mL
OE de cravo-da-índia	0,25%	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴
	0,50%	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴
	0,75%	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴
OE de pimenta preta	0,25%	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴
	0,50%	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴
	0,75%	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴	0,0 b A ²	0,00 b A ²	0,00 x 10 ⁴
OE de gerânio	0,25%	7,0 a A ^{1,2}	5,38 a A	24,31 x 10 ⁴	6,5 a A ^{1,2}	5,32 a A	21,44 x 10 ⁴
	0,50%	5,7 a B ^{1,2}	5,06 a B ^{1,2}	12,13 x 10 ⁴	5,7 a A ^{1,2}	5,14 a B ^{1,2}	13,94 x 10 ⁴
	0,75%	5,0 a C ^{1,2}	4,80 a C ^{1,2}	6,81 x 10 ⁴	3,6 a B ^{1,2}	4,95 a C ^{1,2}	9,94 x 10 ⁴
BDA + fungicida		0,0	0,0	0,00 x 10 ⁴	0,0	0,0	0,00 x 10 ⁴
BDA		8,5	5,40	25,38 x 10 ⁴	8,5	5,37	23,31 x 10 ⁴

Para cada característica avaliada, em cada ensaio:

a, b - em cada nível de concentração, médias de óleos essenciais seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

A, B - em cada nível de óleo essencial, médias de concentrações seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

¹Fungicida tiofanato metílico + fluazinam diferiu de cada tratamento pelo teste de Dunnett (P<0,01)

²BDA diferiu de cada tratamento pelo teste de Dunnett (P<0,01)

Tabela 2. Incidência do fungo *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijão submetidas a tratamentos com óleos essenciais (OE) e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	Incidência de <i>M. phaseolina</i>		Incidência de <i>M. phaseolina</i>	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	% ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	% ¹
OE de cravo 0,25%	2,25 cd	1,50	0,00 d	0,00
OE de cravo 0,50%	1,84 cd	1,00	0,00 d	0,00
OE de cravo 0,75%	0,00 d	0,00	0,00 d	0,00
OE de pimenta-preta0,25%	10,77 b	7,00	11,18 b	7,50
OE de pimenta-preta0,50%	7,67 bcd	5,00	9,52 bc	6,00
OE de pimenta-preta0,75%	9,11 bc	5,50	3,69 cd	2,00
Fungicida	6,86 bcd	4,00	1,84 d	1,00
Semente inoculada	22,69 a	17,00	27,87 a	23,50
Semente não inoculada	0,00 d	0,00	0,00 d	0,00
F	14,41**		34,17**	
C.V. (%)	124,38		117,71	
dms (5%)	8,40		7,03	

¹Dados originais

a, b, c... Em cada coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 3. Germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de feijão submetidas a tratamentos com óleos essenciais (OE) e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1					Ensaio 2				
	PCG		G		IVE	PCG		G		IVE
	arc sen√(x/100)	% ¹	arc sen√(x/100)	% ¹		arc sen√(x/100)	% ¹	arc sen√(x/100)	% ¹	
OE de cravo 0,25%	65,32 a	82,50	66,44 a	84,00	0,25 b	59,43 b	74,00	60,53 b	75,50	0,36 a
OE de cravo 0,50%	43,54 bc	47,50	45,01 b	50,00	0,35 ab	41,33 c	44,00	42,67 c	46,00	0,38 a
OE de cravo 0,75%	24,53 c	17,50	24,53 c	17,50	0,41 ab	28,04 c	22,50	28,41 c	23,00	0,44 a
OE de pimenta-preta0,25%	66,26 a	83,50	66,26 a	83,50	0,41 ab	69,22 ab	87,00	69,22 ab	87,00	0,41 a
OE de pimenta-preta0,50%	68,58 a	86,00	73,17 a	90,50	0,41 ab	73,19 ab	91,00	74,41 ab	92,00	0,40 a
OE de pimenta-preta0,75%	66,58 a	84,00	70,82 a	88,00	0,41 ab	68,19 ab	86,00	69,15 ab	87,00	0,42 a
Fungicida	73,26 a	91,00	77,87 a	93,50	0,51 a	77,59 a	95,00	81,33 a	96,50	0,49 a
Semente inoculada	60,86 ab	72,00	70,82 a	87,00	0,39 ab	70,40 ab	88,50	73,79 ab	92,00	0,44 a
Semente não inoculada	73,31 a	91,50	73,97 a	92,00	0,40 ab	75,36 ab	93,50	76,87 ab	94,50	0,49 a
F	12,97**		25,26**		3,61**	23,40**		23,34**		1,39 ^{NS}
C.V. (%)	14,81		10,89		28,86	11,19		11,33		28,25
dms (5%)	21,23		16,37		0,16	16,65		17,26		0,17

¹Dados originais

a, b, c... Em cada coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

CAPÍTULO 2 - Manejo de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. com agentes biológicos e suas implicações na qualidade fisiológica de sementes de *Phaseolus vulgaris* L.

RESUMO:

A agricultura moderna tem buscado formas alternativas para o tratamento de sementes, visando uma maior preservação ambiental e o emprego de microrganismos antagonistas têm se mostrado eficiente no controle biológico de diversos fungos fitopatogênicos. Buscando uma forma alternativa de controlar *Macrophomia phaseolina* em sementes de feijão, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento biológico com *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e *Trichoderma harzianum* sobre a incidência de *M. phaseolina* e o potencial fisiológico das sementes tratadas. Na primeira etapa, foi testada a ação *in vitro* dos antagonistas sobre o fungo. Constatou-se a ação supressora dos antagonistas, com a formação de halo de inibição no teste de confronto em todos os tratamentos. Em seguida, foi realizado o tratamento de sementes com os antagonistas e o fungicida tiofanato metílico + fluazinam, sendo também incluídas no experimento sementes inoculadas e sementes não inoculadas, ambas sem tratamento. Foram avaliados a sanidade e o potencial fisiológico (germinação; primeira contagem de germinação; índice de velocidade de emergência; comprimento de plântulas). Os três antagonistas reduziram a incidência de *M. phaseolina* nas sementes. Em geral, *B. subtilis* e *T. harzianum* mostraram resultados consistentes e satisfatórios, quanto à germinação e primeira contagem de germinação. Não houve diferença entre os tratamentos quanto ao índice de velocidade de emergência e comprimento de plântulas. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que os antagonistas *B. subtilis* e *T. harzianum* são alternativas viáveis para o manejo de *M. phaseolina* em sementes de feijoeiro.

Palavras-chave: Podridão cinzenta da haste, controle biológico, patologia de sementes, germinação, vigor

ABSTRACT:

Modern agriculture has sought alternative methods for seed treatment, an effort to further environmental preservation. The use of antagonistic microorganisms have been shown to be efficient in the biological control of several phytopathogenic fungi. Searching an alternative way of controlling *Macrophomia phaseolina* in bean seeds, the present work was carried out aiming at evaluating the effect of biological treatment with *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e *Trichoderma harzianum* on this fungus incidence and its implications on the seeds physiological quality. In the first stage, the antagonists *in vitro* action on the fungus was tested. The suppressive action of the antagonists was observed, with an inhibition halo production in the challenge test for all treatments. Then, seed treatment was performed by using antagonists and methyl thiophanate + fluazinam fungicide. Inoculated and uninoculated seeds were also included in the experiment, both without treatment. Seed health and physiological potential (germination, first germination count, emergence speed index and seedlings length) were evaluated. All the antagonists reduced the incidence of *M. phaseolina* in the seeds. In general, *B. subtilis* and *T. harzianum* showed consistent and satisfactory results regarding germination and first germination counting. There was no difference among the treatments for emergence speed index and seedling length. From the results obtained, it can be concluded that *B. subtilis* and *T. harzianum* are viable alternatives for *M. phaseolina* management in common bean seeds.

Key words: Charcoal rot of common bean, biological control, seed pathology, germination, vigour

2.1 Introdução

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado um alimento largamente utilizado na alimentação humana, sendo fonte de nutrientes essenciais como proteínas, cálcio, ferro, zinco, magnésio, vitaminas, carboidratos e fibras (Mesquita et al., 2007). O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores mundiais da cultura (Faostat, 2017), com estimativa de produção de aproximadamente 1.253,2 mil toneladas, na primeira safra 2017/2018 (Conab 2017). Apesar de ser uma cultura

amplamente cultivada com altas estimativas de produtividade, alguns problemas fitossanitários, como a ocorrência de doenças, podem causar grandes prejuízos de nível econômico. A incidência de patógenos na cultura do feijoeiro comum causa perdas na qualidade fisiológica de sementes e desuniformidade na germinação, interferindo no estabelecimento do estande inicial (Carvalho et al., 2011a). Além disso, as sementes são importantes veículos para a introdução e disseminação de patógenos em regiões onde estes ainda não ocorrem. Dentre os vários patógenos de importância epidemiológica que podem comprometer a produção e a qualidade das sementes de feijão, está o fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., causador da podridão cinzenta da haste do feijoeiro. Este fungo é considerado um dos mais importantes e destrutivos patógenos necrotróficos habitantes de solos, podendo infectar mais de 500 espécies de plantas (Gupta et al., 2012), causando redução da produtividade e do rendimento do feijoeiro comum (Wendland et al., 2016). O controle da doença inclui o emprego de sementes saudáveis e tratadas, sendo indicados os fungicidas carboxina (carboxanilida) + thiram (dimetildiocarbamato), fludioxonil (fenilpirrol), difenoconazol (triazol) (Agrofit, 2017).

Tendo em vista a redução da utilização de produtos químicos, métodos alternativos estão sendo sugeridos para o controle da podridão cinzenta da haste do feijoeiro. O controle biológico possui alta especificidade contra fitopatógenos, sendo de baixo custo, além de não causar danos ao meio ambiente. Os mecanismos de ação dos agentes antagônicos são a morte direta do patógeno, através do parasitismo, competição espacial e alimentar, e efeitos tóxicos sobre o patógeno, devido à produção de antibióticos pelo antagonista (Whipps, 2001; Heydari e Pessarakli, 2010). Segundo Calvo et al. (2007) e Heydari e Pessarakli (2010), os microrganismos antagônicos são promissores para a realização do controle biológico de fungos fitopatogênicos, como *M. phaseolina*, podendo até substituir os produtos químicos sintéticos. Produtos comerciais formulados à base de espécies de *Bacillus* e *Trichoderma* estão disponíveis no mercado, sendo recomendados como agentes de biocontrole para diversas doenças de plantas (Bettioli e Morandi, 2009; Dias, 2016; Lenteren et al., 2017). Além disso, alguns isolados também podem estimular o crescimento das plantas (Harman et al., 2004; Vinale et al., 2008) devido à colonização da rizosfera (competência rizosférica), produção de substâncias que

estimulam o crescimento das plantas e solubilização de nutrientes perto das raízes, permitindo que essas substâncias sejam assimiladas pela planta (Harman, 2000).

Com relação ao tratamento de sementes com produtos biológicos, embora os estudos ainda sejam escassos, alguns resultados têm demonstrado a eficiência desta prática no controle de fitopatógenos. A ação antagônica de espécies de *Bacillus* (Singh et al., 2008; Dawar et al., 2010) e *Trichoderma* (Broetto et al., 2014) sobre *M. phaseolina* em tratamento de sementes já foi relatada para várias espécies vegetais, proporcionando a redução do fungo e, em alguns casos, benefício na germinação e crescimento das plântulas.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento de sementes de feijão com os antagonistas *B. subtilis*, *B. pumilus* e *T. harzianum* sobre a incidência de *M. phaseolina* e suas implicações na qualidade fisiológica das sementes tratadas.

2.2 Material e métodos

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Câmpus de Botucatu, SP. O ensaio constou de duas etapas: a avaliação do efeito *in vitro* dos antagonistas *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e *Trichoderma harzianum* sobre *M. phaseolina* e a avaliação do efeito destes produtos no tratamento de sementes de feijoeiro cultivar BRS-Estilo para controle do fungo e sobre a qualidade fisiológica das sementes tratadas.

Efeito *in vitro* de antagonistas sobre *M. phaseolina*

- a) Obtenção do isolado de *M. phaseolina*. O fungo foi isolado de amostra de solo coletada em área da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil, sendo cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), em incubadoras do tipo BOD, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento, o fungo foi repicado para novas placas de Petri contendo meio BDA e incubado nas mesmas condições, para obtenção de colônias puras. O fungo foi inoculado em sementes de feijão (BRS-Estilo), após o surgimento de microescleródios, foi novamente isolado e incubado nas mesmas

condições, sendo preservado em água destilada esterilizada (Castellani, 1939) para a utilização em todo o experimento. Os isolados estão depositados na Micoteca "Mário Barreto Figueiredo", Instituto Biológico, São Paulo, SP, sob os números MMBF 11/18 (Botucatu, SP) e MMBF 12/18 (Maringá -PR).

b) Obtenção dos antagonistas *B. subtilis*, *B. pumilus* e *T. harzianum*. Foram utilizados nos experimentos os seguintes antagonistas (produto comercial): *B. subtilis* linhagem QST 713 (Serenade®), *B. pumilus* linhagem QST 2808 (Sonata®), *T. harzianum* (ECOTRICH®). Para a obtenção das colônias bacterianas, os produtos comerciais de *B. subtilis* e *B. pumilus* foram cultivados em meio nutriente-sacarose-ágar (NSA) e incubados em estufa bacteriológica a 25°C durante 48 horas. Com o intuito de se obter colônias puras, foi realizado o processo de purificação das bactérias, transferindo-se uma alçada da colônia bacteriana para um eppendorf com 900 µL de água destilada autoclavada. Da solução estoque, foram transferidos 100 µL para outro eppendorf com 900 µL de água destilada autoclavada, sendo, em seguida, riscada uma alçada da solução em forma de estrias em meio NSA. Após incubação por 48 horas a 25°C, foi realizada a repicagem de cada bactéria isolada, para uma nova placa com meio NSA, incubando-se nas mesmas condições anteriormente citadas. Para preservação a longo prazo, 70% de nutriente líquido contendo o isolado bacteriano e 30% de glicerol foram colocados em eppendorf, sendo mantidos a -80°C. Para *T. harzianum* foi realizado o processo de diluição fracionada, transferindo-se 100 µL do produto comercial para um eppendorf contendo 900 µL de água destilada autoclavada. Em seguida, 100 µL da solução foram transferidos para outro eppendorf com 900 µL de água destilada autoclavada. O processo foi repetido por seis vezes, sendo então transferidos 100 µL da solução estoque final para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram mantidas em incubadora do tipo BOD, por sete dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. A preservação do isolado fúngico foi realizada pelo método de Castellani (Castellani, 1967).

c) Teste de antagonismo direto sobre *M. phaseolina*. O antagonismo dos isolados de *B. subtilis*, *B. pumilus* e *T. harzianum* contra o isolado de *M. phaseolina* foi avaliado através do teste de confronto. As amostras bacterianas foram reativadas e

cultivadas sobre meio NSA, incubadas em estufa bacteriológica a 25°C durante 48 horas. A suspensão bacteriana foi calibrada para 10^8 UFC/mL. O isolado de *T. harzianum* foi reativado em meio BDA incubado por sete dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas em BOD. Para o teste de confronto, discos de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio de *M. phaseolina* foram depositados a 0,5 cm da borda de placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sem antibiótico. Do lado oposto ao patógeno, a 0,5 cm da borda, foi depositado um disco de papel de filtro (0,5 cm de diâmetro), previamente autoclavado, embebido nas suspensões bacterianas de *B. subtilis* e *B. pumilus* calibradas para a concentração de 10^8 UFC/ mL. No caso de *T. harzianum*, um disco de 0,5 cm de diâmetro de micélio foi posicionado do lado oposto ao fitopatógeno, também a 0,5 cm da borda da placa. Foram adotados três períodos para a deposição dos antagonistas e do fitopatógeno: simultaneamente; antagonistas depositados 24 horas após *M. phaseolina*; e antagonistas depositados 24 horas antes do fungo. A incubação foi realizada em BOD, a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Foram incluídos dois tratamentos testemunha: um composto por *M. phaseolina* e de disco de 0,5 cm de diâmetro de papel de filtro embebido em água destilada autoclavada, e outro com o fitopatógeno e um disco de 0,5 cm de meio BDA puro. O experimento, realizado em duplicata (Ensaio 1 e 2), foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, segundo o esquema fatorial 3x3 (três agentes antagonísticos x três períodos de deposição dos microrganismos) e duas testemunhas, com quatro repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição. A avaliação foi realizada através da medição, em centímetros, do halo de inibição formado pelos agentes antagonistas que demonstraram efeito positivo sobre o controle de *M. phaseolina*. As medições foram iniciadas no quarto dia após a instalação de cada ensaio, até ao controle atingir as bordas da placa de Petri, representando o crescimento máximo. Os resultados da avaliação foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias das testemunhas e do fatorial, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cada tratamento foi comparado com cada testemunha pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade (Banzatto e Kronka, 2006).

Tratamento de sementes de feijoeiro infectadas por M. phaseolina com antagonistas - efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes.

Para a obtenção de sementes infectadas por *M. phaseolina*, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após sete dias de incubação a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados da periferia da colônia fúngica e transferidos para placas de Petri contendo BDA acrescido de manitol, no potencial hídrico de -1,0 MPa (73,77g/L). A concentração do manitol foi determinada pela fórmula de Van't Hoff (Salisbury e Ross, 1991). Sementes da cultivar BRS-Estilo, previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% por um minuto, foram depositadas em camada única, sobre a colônia fúngica, permanecendo em contato com o patógeno por 24 horas. Outra porção de sementes foi submetida às mesmas condições, porém sem a presença do inóculo no meio. Após a inoculação, as sementes passaram novamente pela desinfestação superficial e foram secas. As sementes (inoculadas e sadias) foram misturadas, de modo a se obter um lote de trabalho com 20% de infecção.

Para realização do tratamento biológico das sementes com *B. subtilis* e *B. pumilus*, suspensões bacterianas provenientes de colônias cultivadas em meio NSA a 25°C por 48 horas em estufa bacteriológica foram calibradas para a concentração de 10^8 UFC/mL. Para *T. harzianum*, o fungo foi cultivado em meio BDA e incubado em BOD, por sete dias, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, sendo, então preparada uma suspensão ajustada para a concentração de $1,0 \times 10^6$ conídios/mL. As sementes de feijão foram acondicionadas em vidros tipo duran de 500 mL (400 sementes por recipiente), aos quais foram adicionadas, individualmente, as suspensões dos antagonistas (10 mL de cada suspensão para 400 sementes). Os frascos foram agitados manualmente para a total cobertura das sementes. O tratamento químico foi realizado da mesma maneira que o biológico, sendo as sementes imersas em solução do fungicida Certeza® (tiofanato metílico + fluazinam) na concentração de 750 ppm. Foram incluídos dois tratamentos considerados controle, um composto por sementes inoculadas e outro, por sementes não inoculadas, ambos imersos apenas em água destilada. As sementes foram

incubadas a 25°C, sem fotoperíodo, por 12 horas, e secas em temperatura ambiente por 24 horas.

a) Avaliação sanitária das sementes. A avaliação da incidência de *M. phaseolina* nas sementes foi realizada pelo método do papel de filtro (blotter test) (Brasil, 2009). Em cada placa descartável (9,0cm de diâmetro), foram depositadas três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada, e distribuídas dez sementes equidistantes. As sementes foram incubadas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente, e examinadas, individualmente, sob microscópio estereoscópico (lupa), para a detecção do fungo, após sete dias de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com *M. phaseolina*. O experimento foi realizado em duplicata (Ensaio 1 e 2), no delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis tratamentos e vinte repetições, sendo a parcela experimental constituída por uma placa de Petri com dez sementes de feijão. Os dados, transformados em $\arcsin \sqrt{(x/100)}$ foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Banzatto e Kronka, 2006).

b) Avaliação do potencial fisiológico das sementes. O efeito do tratamento das sementes com os antagonistas sobre o potencial fisiológico destas foi avaliado através do teste de germinação e dos seguintes testes de vigor: primeira contagem de germinação, índice de velocidade de emergência e comprimento de plântulas conforme descrito a seguir.

Germinação e primeira contagem de germinação (PCG). Os testes, realizados concomitantemente, foram realizados de acordo com a técnica do rolo de papel (RP), tendo-se o papel de germinação como substrato. Foram empregadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. O papel de germinação foi pré-umedecido com quantidade de água deionizada equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas e sobrepostas com uma terceira folha, embrulhadas em forma de rolo. Os rolos foram mantidos, no germinador, na posição vertical, a 25°C. As avaliações foram realizadas aos cinco (primeira contagem de germinação) (Nakagawa, 1999) e aos nove (germinação) dias

após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais para cada tratamento (Brasil, 2009).

Índice de velocidade de emergência (IVE). O teste foi conduzido em casa de vegetação em vasos contendo areia esterilizada, com dez repetições de três sementes por tratamento. Foi computado o número de plântulas normais emergidas até a estabilização da emergência, quando se fez a última leitura do IVE, sendo os resultados expressos em porcentagem. Com base no número de plântulas emergidas, foi calculado o IVE, empregando-se a seguinte fórmula:

$$IVE = \frac{E_1 + E_2 + \dots + E_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Onde: N_1, N_2, \dots, N_n = n ° de dias decorridos da semeadura até a primeira, segunda, ..., última contagem. E_1, E_2, \dots, E_n = n ° de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem (Brasil, 2009).

Comprimento de plântulas: ao final do teste de emergência, foi medido o comprimento da parte aérea e do sistema radicular das três plântulas/parcela, sendo os valores somados e expressos em centímetros.

O delineamento experimental empregado nos ensaios de potencial fisiológico das sementes foi o inteiramente casualizado, com as repetições especificadas em cada teste, conforme descrito anteriormente. Resultados expressos em porcentagem foram transformados $\arcsen \sqrt{(x/100)}$. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Banzatto e Kronka, 2006).

2.3 Resultados e discussão

Efeito *in vitro* de antagonistas sobre *M. phaseolina*

A análise estatística revelou haver interação significativa entre antagonistas e períodos de deposição destes e dos fitopatógenos no meio de cultura, para a formação do halo de inibição, em ambos os ensaios. Os resultados do desdobramento destas interações podem ser observados na Tabela 1.

Analisando os resultados dentro de cada período de deposição dos microrganismos, no ensaio 1, observa-se que os halos de inibição não diferiram

estatisticamente entre si quando o *B. subtilis* e *B. pumilus* foram repicados 24 horas antes ou 24 horas após *M. phaseolina*, ambos diferindo de *T. harzianum*. Quando os microrganismos foram depositados simultaneamente no meio, não houve diferença entre os halos de inibição para os antagonistas *B. pumilus* e *T. harzianum*, que diferiram de *B. subtilis*. No segundo ensaio, não houve diferença entre os tratamentos quando os isolados foram repicados simultaneamente. ou 24 horas após *M. phaseolina*. Quando os antagonistas foram depositados antes do patógeno, os halos observados para *B. pumilus* e *T. harzianum* não diferiram entre si, mas diferiram de *B. subtilis* e quando o patógeno foi depositado antes, os halos de inibição não diferiram para as espécies de *Bacillus*, diferindo de *T. harzianum*. Considerando-se cada antagonista separadamente, no ensaio 1, só houve diferença significativa entre os halos de inibição resultantes do tratamento com *T. harzianum*, sendo que, quando este antagonista foi depositado no meio antes ou após o patógeno, os halos não diferiram entre si, mas diferiram daquele obtido com a deposição simultânea. No ensaio 2, as espécies de *Bacillus* tiveram comportamentos semelhantes, resultando em halos que não diferiram quando os antagonistas foram depositados simultaneamente ou 24 horas antes de *M. phaseolina*, ambos diferindo dos halos formados com os antagonistas depositados 24 horas após o patógeno. Não houve diferença entre os halos formados nos diferentes períodos de deposição para o antagonista *T. harzianum*.

Esta etapa do experimento foi conduzida com o intuito de comprovar o efeito dos isolados de antagonistas sobre *M. phaseolina*, para que pudessem então ser empregados no tratamento das sementes. Os resultados obtidos nos dois ensaios confirmaram a ação supressora destes antagonistas sobre o fitopatógeno, concordando com os resultados anteriormente obtidos por Broetto et al. (2014) que constataram a ação inibitória sobre o desenvolvimento de *M. phaseolina* por isolados de *Trichoderma* sp. e Torres et al. (2016), que verificaram inibição de crescimento micelial deste patógeno por *B. subtilis* subsp. *subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, respectivamente.

Tratamento de sementes de feijoeiro infectadas por *M. phaseolina* com antagonistas - efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes.

A análise sanitária, nos dois ensaios, revelou que as sementes não inoculadas estavam isentas de *M. phaseolina* e que o fungicida tiofanato metílico + fluazinam controlou totalmente o patógeno (Tabela 2). O tratamento das sementes infectadas com os três antagonistas testados resultou em redução na incidência deste patógeno, sem diferir estatisticamente do tratamento com fungicida. No segundo ensaio, *T. harzianum* apresentou o mesmo desempenho do fungicida, controlando totalmente o patógeno. Embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos com antagonistas, a incidência de *M. phaseolina* foi mais baixa quando as sementes foram tratadas com *T. harzianum*.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a ação de *T. harzianum* contra fitopatógenos em tratamentos de sementes de feijão anteriormente demonstrada sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Carvalho et al., 2011a), *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Sclerotinia* (Carvalho et al., 2011b). Segundo Jegathambigai et al. (2009), *T. harzianum* e *T. viride* produzem antibióticos como gliotoxina, viridina, enzimas degradadoras da parede celular e metabólitos biologicamente ativos estáveis ao calor, substâncias envolvidas na supressão da doença e ou promoção do crescimento.

O potencial de controle de agentes patogênicos em sementes por espécies de *Bacillus* demonstrado no presente estudo concordam com os obtidos por Bezerra et al. (2013), que investigaram a ação de *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. polymyxa* e *B. licheniformis*, em tratamento de sementes de soja, constatando redução de patógenos como *Fusarium semitectum*, *Cercospora sojina*, *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp. *Penicillium* sp. e três espécies de *Aspergillus*. De acordo com estudos realizados por Ashwini e Srividya (2014), verificou-se intensa atividade das enzimas quitinase, glucanase e celulase produzida por *B. subtilis*, resultando em lise da hifa e degradação da parede celular de *Coletotrichum gloeosporioides*,

Para ser considerada uma técnica viável, além de controlar os possíveis fitopatógenos associados às sementes, o tratamento com agentes biológicos não pode prejudicar o potencial fisiológico destas. O efeito do tratamento com os antagonistas testados sobre a germinação e primeira contagem de germinação (PCG) pode ser observado na tabela 3.

A presença do fungo nas sementes resultou em uma redução significativa na germinação em ambos os ensaios (de 100% de plântulas normais para 85%, no primeiro ensaio, e de 99,5% para 84,0%, no segundo). O tratamento com fungicida proporcionou um bom desempenho na germinação das sementes, sem diferir das sementes isentas do patógeno. O mesmo comportamento foi observado quanto ao vigor, medido através da primeira contagem de germinação (PCG), para estes tratamentos. Com relação ao efeito do tratamento biológico, os três antagonistas promoveram uma redução na germinação no primeiro ensaio, porém, no segundo, *B. subtilis* e *T. harzianum* não diferiram do tratamento fungicida. Quanto à PCG, o efeito dos antagonistas foi bastante variado, mas observa-se que, em ambos os ensaios, *B. pumilus* não diferiu da testemunha inoculada, que resultou nos piores valores para estas características. Apesar de não ter havido uma constância nos efeitos do tratamento biológico, observa-se que, a germinação das sementes tratadas com *B. subtilis* e *T. harzianum* foi superior a 90%, nos dois ensaios, maior que a da testemunha inoculada. Com relação ao índice de velocidade de emergência (IVE) (tabela 4), só houve diferença significativa entre o tratamento fungicida e os tratamentos com as espécies de *Bacillus*, no ensaio 2.

O incremento na germinação e PCG observados para *T. harzianum* e *B. subtilis*, em relação à testemunha inoculada, apesar de não ter sido constatada diferença significativa, comprovam o potencial destes patógenos, anteriormente constatado em sementes de pimenta tratadas com isolados de *Trichoderma* sp. (Asaduzzaman et al., 2010) e soja e milho tratadas com *T. harzianum* (Pal et al., 2013). Segundo Marques et al. (2014), em geral, a aplicação de *Trichoderma* proporciona incrementos na germinação e na precocidade de germinação.

Não houve diferença significativa entre todos os tratamentos para o comprimento de parte aérea e radicular (Tabela 4), em ambos os ensaios. Mertz et al. (2009) também não constataram diferença na estatura de plantas de soja, entre tratamento biológico à base de *Trichoderma* spp. e *B. pumilus*, e tratamento fungicida. Entretanto, é possível observar que, no primeiro ensaio, as plântulas oriundas dos tratamentos com as espécies de *Bacillus* se desenvolveram mais que aquelas provenientes de sementes não inoculadas ou que haviam sido tratadas com o fungicida. Segundo Mariano et al. (2004), as principais bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) utilizadas na agricultura pertencem ao gênero

Bacillus. O tratamento com *T. harzianum* não proporcionou incremento no crescimento de plântulas, conforme havia sido observado por Hoyos-Carvajal et al. (2009), ao avaliar o efeito de sete isolados deste antagonista sobre o crescimento de plântulas de feijoeiro comum, e por Carvalho et al. (2011b), ao testar a utilização de cinco isolados de *Trichoderma* para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijão da cultivar Jalo. Em ambos os experimentos, os autores verificaram que nem todos os isolados testados promoveram o crescimento, comprovando a necessidade de haver competência de rizosfera pelo antagonista para que isso ocorra. Observa-se que, no segundo ensaio, o desenvolvimento das plântulas foi menor que no primeiro, muito provavelmente devido às condições climáticas durante a condução do experimento.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram o potencial antagônico de *B. subtilis* e *T. harzianum* sobre *M. phaseolina*, não tendo, de maneira geral, afetado a germinação e vigor das sementes. Conclui-se, portanto, que o tratamento biológico de sementes de feijão com estes antagonistas é uma técnica viável no manejo deste fungo.

Referências

- AGROFIT – MAPA. **Consulta de produtos formulados**. 2016. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 out. 2017.
- ASADUZZAMAN, M.; ALAM, M.J.; ISLAM, M.M. Effect of *Trichoderma* on seed germination and seed parameters of chili. **Journal of Science Foundation**, v.8, n.1-2, p.141-150, 2010.
- ASHWINI, N.; SRIVIDYA, S. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. **Biotechnology**, v., p.127-136, 2014.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 237p.

- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 341p, 2009.
- BEZERRA, G. A.; MACEDO, D. A.; NASCIMENTO, I. O.; SOUZA, T. P.; COSTA, N. B.; SOUZA, L. F. R. A. Uso de *Bacillus* spp. no controle de fitoátógenos em sementes de soja variedade BRS VALIOSA RR. **Agroecossistemas**. v. 5, n. 1, p. 68-73, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária: Brasília, 2009. 395p.
- BROETTO, L.; COLTRO-RONCATO, S.; MEINERZ, C.C.; DILDEY, O.D.F.; PAZDIORA, P.C.; GONÇALVES, E.D.V.; MORAES, A.J.; HENKEMEIER, N.P.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Sci. Agrar. Paran.**, v.13, n.4, p.310-317, 2014.
- CALVO, J., CALVENTE, V., DE ORELLANO, M.E., BENUZZI, D., SANZ DE TOSETTI, M.I., Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.113, p. 251–257.2007.
- CARVALHO, D. D. C., MELLO, S. C. M., LOBO JUNIOR, M., SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Trop Plant Pathol.**, v.36, p.28-34, 2011a.
- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. de; LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A.M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.46, n.8, p.822-828, 2011b.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 4- Safra 2015/16 – Quarto levantamento, Brasília, p. 1-154, janeiro 2016. ISSN 2318-6852. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf. Acesso em: 06. Nov. 2017.

- DAWAR, S.; WAHAB, S.; TARIQ, M.; ZAKI, M.J. Application of *Bacillus* species in the control of root rot diseases of crop plants. **Arch. Phytopathology Plant Protect**, v.43, n.4, p.412-418, 2010.
- DIAS, R.P. Produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica no Brasil. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Brasília. 2016.
- FAO. **Faosfat**. Disponível em: <faosfat.fao.org>. Acesso em: 06 Nov. 2017.
- GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K. ; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **J. Phytopathol**, v.160, p.167–180, 2012.
- HARMAN, G. E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Dis.**, v.84, p.377-393, 2000.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.2, p.43-56, 2004.
- HEYDARI, A., PESSARAKLI, M. A review on biological control of fungal plantpathogens using microbial antagonists. **J. Biol. Sci.** v.10, p.273–290. 2010
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biol. Control**, v.51, p.409-416, 2009.
- JEGATHAMBIGAI, V.; WITERATNAM, R.S.W.; VIJESUNDERA, R.L.C. *Trichoderma* as a seed treatment to control *Helminthosporium* leaf spot diseases of *Chrysalidocarpus lutescens*. **WJAS**, v.5, n.6, p.720-728, 2009.
- LENTEREN, J. C; BOLCKMANS, K.; KOHL, J.; RAVENSBERG, W. J.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**. v.4, p.1. 2017.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.; DONATO, V.M.T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para um agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agronômicas**, v.1, p. 89-111, 2004.
- MARQUES, E.; SANTOS, D.B.; SILVA, J.B.T.; MARTINS, I.; MELLO, S.C.M. Avaliação do tratamento biológico com isolados de *Trichoderma* spp. na

- germinabilidade de sementes de feijão. **Cadernos de Agroecologia**, v.9, n.3, 2014.
- MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciênc. Rural**, v.39, n.1, p.13-18, 2009.
- MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciênc. Agrotéc.**, v.31, n.4, p.1114-1121, 2007.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. cap. 2, p.1-24.
- PAL, G.K.; POOJA; KUMAR, P. Enhancing seed germination of maize and soybean by using botanical extracts and *Trichoderma harzianum*. **Curr. Discovery**, v.2, n.1, p.72-75, 2013.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4 ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.
- SINGH, N.; PANDEY, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roseburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. **Word J. Microbiol. Biotechnol** (2008) 24:1669 disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-00809680-z>.
- TORRES, M.J.; PÉREZ BRANDAN, C.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M.C. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiol Res.**, v.183, p.31-39, 2016.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathology interactions. **Soil Biol. and Biochem.**, v.40, p.1-10, 2008.
- WENDLAND, A.; MOREIRA, A.S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN. J.S.; LOBO JUNIOR, M. Doenças do Feijoeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 5. ed. São Paulo: Ceres. v. 2, p. 383–390. 2016

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **J. Exp.Bot.** v.52, p.487–511. 2001.

Tabela 1. Ação *in vitro* dos antagonistas *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e *Trichoderma harzianum* sobre *Macrophomina phaseolina*, com diferentes períodos de deposição dos microrganismos no meio de cultura.

Tratamentos	Ensaio 1	Ensaio 2
	Halo de inibição (cm)	Halo de inibição (cm)
<i>B. subtilis</i> deposição simultânea	2,50 a A ^{1,2}	1,97 a B ^{1,2}
<i>B. subtilis</i> 24 horas após <i>M. phaseolina</i>	2,58 a A ^{1,2}	2,95 a A ^{1,2}
<i>B. subtilis</i> 24 horas antes de <i>M. phaseolina</i>	1,93 a A ^{1,2}	2,23 a B ^{1,2}
<i>B. pumilus</i> deposição simultânea	1,70 b A ^{1,2}	1,88 a B ^{1,2}
<i>B. pumilus</i> 24 horas após <i>M. phaseolina</i>	2,05 a A ^{1,2}	2,75 a A ^{1,2}
<i>B. pumilus</i> 24 horas antes de <i>M. phaseolina</i>	1,85 a A ^{1,2}	1,73 b B ^{1,2}
<i>T. harzianum</i> deposição simultânea	1,73 b A ^{1,2}	1,63 a A ^{1,2}
<i>T. harzianum</i> 24 horas após <i>M. phaseolina</i>	1,03 b B ^{1,2}	1,45 b A ^{1,2}
<i>T. harzianum</i> 24 horas antes de <i>M. phaseolina</i>	0,80 b B ^{1,2}	1,53 b A ^{1,2}
Testemunha disco papel	0,00*	0,00*
Testemunha disco meio de cultura	0,00	0,00

Em cada ensaio (coluna):

a, b - em cada período de deposição dos microrganismos, médias de antagonistas seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

A, B - em cada nível de antagonista, médias de períodos de deposição dos microrganismos seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

*Tratamentos testemunha não diferem entre si (Tukey (P>0,05))

¹Cada tratamento diferiu da testemunha disco de papel pelo teste de Dunnett (P<0,01)

²Cada tratamento diferiu da testemunha meio de cultura pelo teste de Dunnett (P<0,01)

Tabela 2. Incidência (%) de *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijoeiro tratadas com *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e *Trichoderma harzianum* e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	% ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	% ¹
<i>Bacillus subtilis</i>	4,09 b	2,50	3,17 b	2,00
<i>Bacillus pumilus</i>	6,75 b	4,50	3,17 b	2,00
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,84 b	1,00	0,00 b	0,00
Fungicida tiofanato metílico + fluazinam	0,00 b	0,00	0,00 b	0,00
Sementes inoculadas não tratadas	25,65 a	21,50	26,96 a	24,00
Sementes não inoculadas	0,00 b	0,00	0,00 b	0,00
Teste F	31,00**		44,91**	
C.V.%	123,00		127,48	
dms (5%)	7,20		6,49	

¹dados originais

**significativo a 1%

a, b - em cada ensaio, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 3. Germinação (G) e primeira contagem de germinação (PCG) de sementes de feijão submetidas ao tratamento com *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Trichoderma harzianum* e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1				Ensaio 2			
	PCG		G		PCG		G	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	% ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	% ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	% ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	% ¹
<i>Bacillus subtilis</i>	76,47 abc	94,00	77,43 b	95,00	75,36 a	93,50	85,08 ab	98,50
<i>Bacillus pumilus</i>	70,83 bc	89,00	72,67 bc	91,00	65,21 b	82,00	69,62 c	87,00
<i>Trichoderma harzianum</i>	67,45 c	85,00	75,14 b	93,00	69,68 ab	87,50	74,70 bc	93,00
Fungicida tiofanato metílico + fluazinam	83,05 a	98,00	87,97 a	99,50	74,70 a	93,00	85,08 ab	98,50
Sementes inoculadas não tratadas	66,52 c	84,00	67,34 c	85,00	62,65 b	78,50	67,22 c	84,00
Sementes não inoculadas	79,25 ab	95,00	90,00 a	100,00	76,08 a	94,00	87,97 a	99,50
F	6,79**		28,03**		7,76**		9,36**	
C.V. (%)	6,96		4,27		5,80		7,44	
dms (5%)	11,56		7,52		9,20		13,09	

¹dados originais

**significativo a 1%

a, b, c – em cada ensaio, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 4. Índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento da parte aérea (CPA) e radicular (CPR) de plântulas de feijoeiro provenientes de sementes submetidas ao tratamento com *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Trichoderma harzianum* e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1			Ensaio 2		
	IVE	CPA (cm)	CPR (cm)	IVE	CPA (cm)	CPR (cm)
<i>Bacillus subtilis</i>	0,46 a	7,03 a	9,45 a	0,46 b	5,13 a	4,98 a
<i>Bacillus pumilus</i>	0,38 a	7,23 a	9,08 a	0,39 b	3,85 a	4,13 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,49 a	4,15 a	4,68 a	0,52 ab	3,90 a	3,68 a
Fungicida tiofanato metílico + fluazinam	0,53 a	5,50 a	7,43 a	0,63 a	5,20 a	6,13 a
Sementes inoculadas não tratadas	0,38 a	5,48 a	7,68 a	0,53 ab	4,85 a	5,18 a
Sementes não inoculadas	0,46 a	5,73 a	6,88 a	0,54 ab	6,00 a	6,58 a
Teste F	2,59*	2,64 ^{NS}	2,16 ^{NS}	4,68**	2,10 ^{NS}	2,38 ^{NS}
C.V.%	26,19	23,89	30,99	23,11	23,65	28,35
dms (5%)	0,16	3,14	5,24	0,16	2,56	3,25

** - significativo a 1%; * significativo a 5%; ^{NS} - não significativo.

a, b – em cada ensaio, para cada variável, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento de sementes com produtos químicos sintéticos é uma técnica eficiente e amplamente empregada no manejo de patógenos de sementes, promovendo incremento na germinação destas. Com o intuito de minimizar os efeitos negativos do uso de produtos químicos sintéticos, como a contaminação ambiental e humana, e aumentar a produção de alimentos de melhor qualidade, formas alternativas de controle têm sido pesquisadas para compor o manejo integrado de doenças de plantas (MID). Sendo assim, a utilização de produtos naturais extraídos de plantas, tais como os óleos essenciais e extratos vegetais, e agentes de controle biológico no tratamento de sementes tem sido investigada, demonstrando eficiência no controle de fitopatógenos.

Os resultados apresentados neste estudo comprovam a ação antifúngica dos óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta-preta e dos agentes de controle biológico *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* sobre *Macrophomina phaseolina* nos ensaios *in vitro* e *in vivo* (tratamento de sementes), sem prejudicar a qualidade fisiológica das sementes.

As informações geradas nesta pesquisa representam, portanto, uma alternativa de manejo deste patógeno com potencial aplicabilidade principalmente na agricultura orgânica, onde se exige isenção de aplicação de produtos químicos

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, T.M.; ALI, Y.N.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v.27, p.1354–1359, 2008.

AGROFIT – MAPA. **Consulta de produtos formulados**. 2016. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 out. 2017.

AKRAMI, M.; SABZI, M.; MEHMANDAR, F.B.; KHODADADI, E. Effect of seed treatment with *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* species controlling *Fusarium* rot of common bean. **Annals of Biological Research**, v.3, n.5, p.2187-2189, 2012.

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C.D.S.; FARIAS, J.R.B.; OLIVEIRA, M.C. NEVES.; FRANCHINI, J.C.; DEBIASI, H.; COSTA, J.M.; GAUDÊNCIO, C.A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n.346).

ARAUJO NETO, A.C.A.; ARAUJO, P.C.; SOUZA, W.C.O.; MEDEIRO, J.G.F.; AGUIAR, A.V.M. Óleo essencial de anis na incidência e controle de patógenos em sementes de erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Revista Verde**, Mossoró – RN, v.7, n.1, p.170-176, 2012.

ASADUZZAMAN, M.; ALAM, M.J.; ISLAM, M.M. Effect of *Trichoderma* on seed germination and seed parameters of chili. **Journal of Science Foundation**, v.8, n.1-2, p.141-150, 2010.

ASHWINI, N.; SRIVIDYA, S. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. **Biotech**, v., p.127-136, 2014.

BARD, M.; ALBRECHT, M.; GUPTA, N.; GUYNN, C. J.; STILLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v.23, p.534-538, 1988.

CALVO, J., CALVENTE, V., DE ORELLANO, M.E., BENUZZI, D., SANZ DE TOSETTI, M.I., Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.251-257, 2007

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. de; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes e promoção do

crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.36-42, 2011a.

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. de; LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A.M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.822-828, 2011b.

CAVAGLIERI L, ORLANDO J, RODRIGUEZ MI. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v.156, p.748–54, 2005.

CHOUDHARY, D.K., JOHRI, B.N., Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiology Research** v.164, p.493-513, 2009.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 4- Safra 2015/16 – Quarto levantamento, Brasília, p. 1-154, janeiro 2016. ISSN 2318-6852. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf. Acesso em: 06. Nov. 2017.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.

DAWAR, S.; WAHAB, S.; TARIQ, M.; ZAKI, M.J. Application of *Bacillus* species in the control of root rot diseases of crop plants. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.43, n.4, p.412-418, 2010.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Imprensa Universitária, 1978.

FERRIGO, D.; RAIOLA, A.; RASERA, R.; CAUSIN, R. *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. **Crop Protection**, v.65, p.51-56, 2014.

GOULART, A.C.P. Tratamento de sementes com fungicidas. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste. **Algodão**. Infomações técnicas. Dourados: EMBRAPA-CPAO: Campina Grande: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.71-84.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K. ; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v.160, p.167–180, 2012.

HARMAN, G. E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.377-393, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes**. Noções gerais. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2004. 51p. Documentos n.235.

HEYDARI, A., PESSARAKLI, M., A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. **Journal of Biological Sciences**.v.10, p.273–290, 2010.

HOBLEY, L., OSTROWSKI, A., RAO, F.V., BROMLEY, K.M., PORTER, M., PRESCOTT, A.R., MACPHEE, C.E., VAN AALTEN, D.M., STANLEY-WALL, N.R., 2013. BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.110, p. 13600–13605. 2013.

HUANG, C.J.; WANG, T.K.; CHUNG, S.C.; CHEN, C.Y. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus*. **Journal of Biochemical and Molecular Biology Sciences**, v.38, p.82–88, 2005.

JEGATHAMBIGAI, V.; WITERATNAM, R.S.W.; VIJESUNDERA, R.L.C. *Trichoderma* as a seed treatment to control *Helminthosporium* leaf spot diseases of *Chrysalidocarpus lutescens*. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.5, n.6, p.720-728, 2009.

JOSEPH, B.; PATRA, R.R.; LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting *Rhizobacteria* associated with chickpea (*Cicer arietinum* L). **International Journal of Plant Production**, v.1, p.141–152, 2007.

KAVEH, H.; JARTOODEH, S.V.; ARVEE, H.; MAZHAGI, M. Would *Trichoderma* affect seed germination and seedling quality of two muskmelon cultivars, Khatooni and Qasri, and increase their transplanting success? **Journal of Biology and Environmental Science**, v.5, n.15, p.169-175, 2011.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v.99, p.8788–8795, 2008.

LEITE, R. P.; MEDEIROS, J. G. F.; NASCIMENTO, L. C. Produtos naturais e seus efeitos sobre a microflora e fisiologia em sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). In: SEABRA, G.; MENDONÇA, I. (Eds.). **Educação ambiental: Responsabilidade para a conservação da sociobiodiversidade**. João Pessoa: Editora Universitária, 2011. p.559-564.

MABUCHI, N.; HASHIZUME, I.; ARAKI, Y. Characterization of chitinases exerted by *Bacillus cereus* CH. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.370–375, 2000.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**, v.100, p.1213-1221, 2010.

MEDEIROS, J. G. F.; LEITE, R. P.; NASCIMENTO, L. C. Extratos vegetais e seus efeitos na sanidade e fisiologia de sementes de flamboyant-mirim (*Caesalpinia pulcherrima* L.). In: SEABRA, G.; MENDONÇA, I. (Eds.). **Educação ambiental: Responsabilidade para a conservação da sociobiodiversidade**. João Pessoa: Editora Universitária, 2011. p.373-377.

MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.31, n.4, p.1114-1121, 2007.

MORAES, M.H.D. Análise de sementes tratadas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa, PB. **Palestras e Resumos...**, João Pessoa: Tropical Hotel Tambaú, 2004. p.99.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p.4050-4063, 2009.

NAGORSKA, K., BIKOWSKI, M., OBUCHOWSKI, M., 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. **Acta Biochimica Polonica** 54, 495–508.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; LEKAGNE DONGMO, J.B.; TORP, J.; AMVAM ZOLLO, P.H.; NYASSE, S. Use of three essential oils as seed treatments against seed-born fungi of rice (*Oryza sativa* L.). **American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science**, v.4, p.554–560, 2008.

NUZHAT, T.; VIDYASAGAR, G.M. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, Supl.2, p.19-28, 2013.

ONGENA, M., JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology** 16, 115–125, 2008.

PAL, G.K.; POOJA; KUMAR, P. Enhancing seed germination of maize and soybean by using botanical extracts and *Trichoderma harzianum*. **Current Discovery**, v.2, n.1, p.72-75, 2013.

PIPER, P.; CALDERON, C. O.; HATZIXANTHIS, K.; MOLLAPOUR, M. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, v.147, p.2635-2642, 2001.

PODILE, A.R.; PRAKASH, A.P. Lysis and biological control of *A. niger* by *Bacillus subtilis* AF1. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.533–538, 1996.

POMELLA, A.W.V.; RIBEIRO, R.T.S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas - uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org.). **Biocontrole de doenças de Plantas**. Uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.239-244.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.301-307, 2008.

SALVADOR, C.A. Feijão. Análise da conjuntura agropecuária. Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2012. Disponível em:
http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao_2012_13.pdf
Acesso em 10 dez.2014

SANTOS, A. **Princípios de controle de doenças**. Bahia: Universidade Estadual do Sul da Bahia. 2014. Disponível em
http://www.uesb.br/utilitarios/modelos/monta.asp?site=fitopatologia&tex=i_03_sementes2.html Acesso em 20 jul. 2014.

SCHAWN-ESTRADA, K.R.F; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMERO, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. P.125-138.

SINGH, N.; PANDEY, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roseburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. **Word J.**

Microbiol. Biotechnol (2008) 24:1669 disponível em:
<https://doi.org/10.1007/s11274-00809680-z>.

SOMEYA, N.; NAKAJIMA, M.; HIRAYAE, K.; HIBI, T.; AKUTSU, K. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2 against the gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. **Journal of Genetic Plant Pathology**, v.67, p.312–317, 2001.

TAKAYANAGI, T.; AJISAKA, K.; TAKIGUCHI, Y.; SHIMAHARA, K. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. **Biochem Biophys Acta**, v.12, p.404–410, 1991.

TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, v.75, p.347–353, 1991.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathology interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.1-10, 2008.

VITERBO, A.; HARAN, S.; FRIESEM, D.; RAMOT, O.; CHET, I. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. **FEMS Microbiol Lett**, v. 200, p.169–174, 2001.

WENDLAND, A.; MOREIRA, A. S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN. J. S.; LOBO JUNIOR, M. Doenças do Feijoeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2016. v. 2, p. 383–390.

WEN, C.; TSENG, M.C.S.; CHENG, C.Y.; LI, Y.K. Purification, characterization and cloning of a chitinases from *Bacillus* sp. NCTU2. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.35, p.213–219, 2002.

WHIPPS, J.M.,. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.487–511, 2001

XUE, A. G; CHEN, YUANHONG; _SIDDIQUI, I; MARCHAND, G; LIU, J; REN, C. Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* spp. on establishment and yield of spring wheat. **Crop Protection**, v.96, p.97-102. 2017.

YU, G.Y.; SINCLAIR, G.L.; HARTMAN, G.L.; BERTAGNOLLI, B.L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.955–963, 2002.

ZAMBOLIM, L. Importância do tratamento de sementes no manejo integrado de doenças. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa, PB. **Palestras e Resumos...**, João Pessoa: Tropical Hotel Tambaú, 2004. p.94-94.

ZHANG, Y.; FERNANDO, W.G.D. Zwittermicin A detection in *Bacillus* spp. controlling *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. **Phytopathology**, v.94, S116, 2004.