

LARISSA MOREIRA CHAGA

**INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES
DE FEIJÃO COM O USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E FUNGOS ANTAGONISTAS**

**Botucatu
2022**

LARISSA MOREIRA CHAGA

**INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES
DE FEIJÃO COM O USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E FUNGOS ANTAGONISTAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Zanin Kronka

Botucatu

2022

C433i Chaga, Larissa Moreira
Inibição do desenvolvimento de *sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão com o uso de óleos essenciais e fungos antagonistas / Larissa Moreira Chaga. -- Botucatu, 2022
70 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientadora: Adriana Zanin Kronka

1. Controle alternativo. 2. Controle biológico. 3. Mofo branco do feijoeiro. 4. *Clonostachys rosea*. 5. *Trichoderma* spp.. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE *Sclerotinia Sclerotiorum* EM SEMENTES DE FEIJÃO COM O USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E FUNGOS ANTAGONISTAS

AUTORA: LARISSA MOREIRA CHAGA

ORIENTADORA: ADRIANA ZANIN KRONKA

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

Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA (Participação Virtual)
Proteção de Plantas / Universidade Estadual Paulista campus Botucatu

Prof.^a Dr.^a CRISTIANE DE PIERI (Participação Virtual)
Prof.^a Substituta - Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu

pl

Profa. Dra. TATIANA TOZZI MARTINS SOUZA RODRIGUES (Participação Virtual)
Agronomia / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais

pl

Botucatu, 27 de janeiro de 2022

A minha querida mãe, Rita Moreira. Por me guiar durante minhas dificuldades e me incentivar a seguir adiante independente dos problemas enfrentados.

Ao meu namorado Wanderson Lincoln, por todo o amor, carinho, compreensão e apoio durante esses anos.

Aos meus irmãos, por todo apoio e incentivo que me deram durante esses anos.

Aos meus sobrinhos Victor, João e Maria Rita, por todo o amor, alegria e carinho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida, por guiar meus passos e sempre iluminar meu caminho, por me dar saúde, força e fé, deixando esta jornada mais branda.

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Zanin Kronka, pelo apoio, dedicação, paciência e atenção durante esses anos para que meu sonho se tornasse realidade. Meu muito obrigada por tudo, serei eternamente grata.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, pela grande oportunidade de fazer parte dessa instituição.

À Profa. Dra. Maria Marcia Pereira Sartori, pela orientação nas análises estatísticas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos e que de uma forma direta ou indireta, contribuíram para que eu alcançasse meus objetivos.

As minhas amigas Claudia Vilalva, Geovana Gonçalves, Sirlene Lopes e Tamires Borges, amigas fieis companheiras e conselheiras, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Às amigas mais que especiais Mariane Riceto e Rosicléia da Silva pelo carinho, amizade, apoio, pelas várias noites em claro, estudando para as provas, pelas longas conversas, nos momentos tristes e de descontração.

Ao professor Dr. Wagner Bettiol por contribuir com os isolados de *S. sclerotiorum*, *C. rosea* e *Trichoderma* spp.

À Destilaria Bauru pela disponibilização dos óleos essenciais.

E agradeço imensamente aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade de participar desse momento muito especial para mim.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001

RESUMO

O feijoeiro-comum é suscetível ao mofo branco, doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum* e que resulta em redução da produtividade devido à morte das sementes e das plântulas, além de poder originar plantas infectadas. O seu controle envolve uma série de medidas integradas, incluindo o tratamento de sementes. A pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento sementes de feijão com os óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia e pimenta-preta (Capítulo I) e com os antagonistas *Clonostachys rósea* e *Trichoderma* spp. (Capítulo II) sobre a incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes e a qualidade fisiológica das sementes tratadas. No primeiro capítulo, inicialmente, os OE foram adicionados ao meio de cultura BDA para verificar o seu efeito *in vitro* sobre o desenvolvimento fúngico. BDA + fungicida tiofanato metílico + fluazinam e BDA puro constituíram os tratamentos testemunhas. O OE de cravo-da-índia promoveu 100% de inibição no crescimento fúngico, com desempenho igual ao do fungicida. O OE de pimenta-preta apresentou potencial de controle *in vitro*, porém com menor eficiência. Em seguida, as sementes foram tratadas com os OEs, para avaliar seus efeitos na qualidade sanitária e fisiológica das sementes. Sementes tratadas com tiofanato metílico + fluazinam (750 ppm), sementes não inoculadas e sementes inoculadas, ambas sem tratamento, foram incluídas no experimento. A sanidade foi avaliada pelo método do papel filtro. Não houve incidência do patógeno nas sementes tratadas com OE e fungicida. Para avaliar a qualidade fisiológica, foram realizados testes de germinação de vigor (primeira contagem de germinação - PCG). Para avaliar o efeito do tratamento de sementes no desenvolvimento das plântulas, o índice de velocidade de emergência (IVE) em substrato e o comprimento e massa fresca e seca da parte aérea e radicular das plântulas foram avaliados em casa-de-vegetação. Não houve diferença entre as sementes inoculadas e não inoculadas, ambas sem tratamento, para todas as variáveis estudadas. Com exceção do OE de cravo a 0,75%, que interferiu negativamente na PCG e germinação, os demais tratamentos não tiveram efeito no potencial fisiológico das sementes. Com relação aos testes conduzidos em substrato, o OE de cravo-da-índia mostrou-se fitóxico nas concentrações avaliadas, impedindo a germinação das sementes. O OE de pimenta-preta interferiu negativamente no IVE, mas à concentração de 0,75%, proporcionou

desenvolvimento de plântulas satisfatório. No segundo capítulo, o experimento de biocontrole foi iniciado por uma etapa *in vitro*, para avaliar a ação dos antagonistas sobre *S. sclerotiorum*. Os dois antagonistas tiveram efeito inibitório sobre o patógeno, com maior ação supressora de *C. rosea*. Em seguida, foi feito o tratamento de sementes com os antagonistas e o fungicida tiofanato metílico + fluazinam. Sementes inoculadas e não inoculadas, ambas sem tratamento, foram incluídas no experimento. Foram analisadas a sanidade e a qualidade fisiológica das sementes conforme descrito para os experimentos de OE. Os antagonistas não controlaram o patógeno nas sementes. De maneira geral, o tratamento biológico não interferiu na qualidade fisiológica das sementes e no desenvolvimento das plântulas. O OE de pimenta-preta mostrou potencial de uso no tratamento de sementes para controle de *S. sclerotiorum*, porém, mais estudos são necessários para melhorar a eficiência do tratamento no que diz respeito à qualidade fisiológica. Com relação ao tratamento biológico, apesar do efeito inibitório *in vitro*, os antagonistas não controlaram o patógeno nas sementes, sugerindo a necessidade de ajustes na aplicação do tratamento.

Palavras-chave: Controle alternativo; controle biológico; mofo branco do feijoeiro; *Clonostachys rosea*; *Trichoderma* spp.; patologia de sementes.

ABSTRACT

Common bean is susceptible to white mold disease, which is caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. White mold results in reduced yield due to seeds and seedlings death, besides originating infected plants. This disease control involves a series of integrated measures, including seed treatment. This research aimed to evaluate the effect of bean seeds treatment with clove and black pepper essential oils (EOs) (Chapter I), as well as *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* spp. antagonists (Chapter II) on *S. sclerotiorum* incidence in the seeds and on their physiological quality. In the first chapter, EOs were added to the PDA culture medium to verify their *in vitro* effect on fungal development. PDA with thiophanate methyl + fluazinam fungicide and pure PDA constituted the control treatments. Clove EO inhibited 100% of fungal growth, which was similar to the fungicide performance. Black pepper EO showed *in vitro* control potential, but with lower efficiency. Then, the seeds were treated with EOs in order to evaluate their effects on the seeds sanitary and physiological qualities. Seeds treated with thiophanate methyl + fluazinam (750 ppm), untreated uninoculated seeds and untreated inoculated seeds were included in the experiment. Seed sanitary quality was evaluated with blotter test. There was no pathogen incidence in the seeds treated with EO and fungicide. Aiming to evaluate the seed physiological quality, germination and vigor (first germination count - PCG) tests were carried out. In order to evaluate the seed treatments effect on seedling development, emergence speed index (IVE), root and shoot length, as well as root and shoot fresh and dry mass were studied in greenhouse experiments. There was no difference between untreated inoculated and untreated uninoculated seeds for all variables studied. Except for clove EO at 0.75%, which negatively interfered with PCG and germination, the other treatments had no effect on the seeds physiological quality. Regarding the tests carried out in substrate, clove EO proved to be phytotoxic at the concentrations evaluated, preventing seed germination. Black pepper EO had a negative effect on the IVE, however, at a concentration of 0.75%, it provided satisfactory seedling development. In the second chapter, the biocontrol experiment started with an *in vitro* phase, in order to evaluate the antagonists action on *S. sclerotiorum* development. Both antagonists had an inhibitory effect on the pathogen, on which *C. rosea* presented a higher suppressive action. Then, the seeds were

treated with antagonists and thiophanate methyl + fluazinam fungicide. Untreated inoculated and untreated uninoculated seeds were included in the experiment. Seeds sanitary and physiological qualities were evaluated as previously described. The antagonists did not control the pathogen in the seeds. In general, the biological treatment did not interfere either seeds physiological quality or in the seedlings development. Black pepper EO showed promising use for seed treatment to control *S. sclerotiorum*. However, more studies are needed to improve this treatment efficiency regarding the physiological quality. Concerning the biological treatment, despite the antagonists *in vitro* inhibitory effect, they did not control the pathogen in the seeds, suggesting that adjustments in this treatment application are necessary.

Keywords: Alternative control; biological control; bean white mold; *Clonostachys rosea*; *Trichoderma* spp.; seed pathology.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO 1 - Tratamento de sementes de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) com óleos essenciais para o manejo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....	23
1.1 Introdução.....	25
1.2 Material e Métodos.....	27
1.3 Resultados e Discussão.....	31
Referências	41
CAPÍTULO 2 - Manejo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> com agentes de biocontrole no tratamento de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	46
2.1 Introdução.....	47
2.2 Material e Métodos.....	49
2.3 Resultados e Discussão.....	54
Referências	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

INTRODUÇÃO GERAL

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa pertencente à família *Fabaceae*, com o centro de origem no continente americano (DEBOUCK, 1993). Por sua importância econômica, o cultivo do feijão é responsável por gerar emprego e renda para milhares de produtores rurais. É também caracterizado como a principal fonte de proteína de origem vegetal incluída na dieta do brasileiro, devido ao seu elevado valor energético em comparação aos outros alimentos (SANTOS; GAVINALES, 2006). O Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking dos países produtores, tendo a maior produção e consumo (FAOSTAT, 2019).

O feijoeiro possui boa adaptação edafoclimática, o que permite o seu cultivo ao longo do ano em todo o território nacional. No Brasil, o feijoeiro é cultivado em três diferentes épocas do ano, sendo a safra “das águas”, de agosto a novembro; a safra “da seca”, de janeiro a março e a safra “de inverno”, de abril a julho (CONAB, 2020). Conforme o levantamento da safra 2020/2021, estima-se um volume final de 3.136,6 mil toneladas de produção, somando os feijões do tipo comum cores, comum preto e o caupi. Essa estimativa indica uma queda na produtividade de aproximadamente 6,5% em relação ao levantamento obtido em 2019/20, devido às oscilações do clima registradas ao longo do ciclo, principalmente na Região Sul do país e na Bahia (CONAB, 2021).

A incidência de doenças é um dos principais fatores para a redução da produtividade do feijoeiro, podendo-se ter perda total da produção, depreciação da qualidade fisiológica das sementes, desuniformização na germinação, que conseqüentemente, interfere no estabelecimento do estande inicial ou inviabilização de determinada área para o cultivo (MESQUITA et al., 2017). A semente é considerada um veículo eficiente no transporte e disseminação de patógenos, além de ser um abrigo seguro à sua sobrevivência. As sementes também podem introduzir o fitopatógeno em regiões onde estes ainda não ocorrem. Dentre os diversos patógenos de importância epidemiológica que podem afetar a produção e a qualidade das sementes de feijão, encontra-se o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, agente causal da doença mofo branco. Esse fungo é considerado um importante e severo patógeno habitante de solo, por ser capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiro e de produzir escleródios, estruturas de resistência que

podem sobreviver no solo por longos anos na ausência de uma planta hospedeira (BIANCHINI FILHO; MARINGONI; CARNEIRO, 2016).

A infecção do feijão por *S. sclerotiorum* abrange diferentes processos e a etapa em que a cultura fica mais vulnerável ao ataque do patógeno é no estágio de florescimento pleno (SANTOS, 2013). Esse fungo é caracterizado por apresentar um ciclo de vida complexo, sendo este de reprodução sexuada, caracterizada pela germinação dos escleródios carpogenicamente, e assexuada, pela germinação miceliogênica (GÖRGEN, 2009). Inicialmente, na germinação carpogênica, há formação de apotécios que emergem na superfície do solo, produzindo os ascos, que quando maduros, liberam os ascósporos no ambiente durante vários dias, sendo estes disseminados pelo vento e depositados sobre as flores, infectando-as. As pétalas infectadas caem ao solo ou entram em contato com outras partes da planta, colonizando todo o tecido saudável (SANTOS, 2013). Já na germinação miceliogênica, os escleródios ficam na superfície do solo, onde há formação de hifas pelo patógeno que atacam diretamente os tecidos da raiz, danificando-as, o que ocasionará o apodrecimento do caule (WUTZKI, 2014).

Quando semeadas sementes sadias em solos contaminados por *S. sclerotiorum*, pode-se verificar sintomas como "damping-off" de pré ou pós emergência nas sementes, provocando assim, a redução da população de plantas na área (WENDLAND et al., 2016). O patógeno pode sobreviver na forma de micélio ou por escleródios em mistura com sementes (DHINGRA, 2005; REIS, 2013). O micélio dormente fica no interior das sementes, nos cotilédones, mantendo a sua viabilidade por um longo tempo, e após a semeadura no campo, sob condições favoráveis de umidade e temperatura, retoma sua atividade metabólica, matando a semente e produzindo novos escleródios que irão germinar na mesma safra. As sementes infectadas são veículos de disseminação da doença em áreas sem histórico do mofo branco (WENDLAND et al., 2016).

O controle de *S. sclerotiorum* é um pouco complexo devido, à ausência de cultivares resistentes, à variabilidade genética do fitopatógeno, à presença de escleródios no solo, à sua sobrevivência em sementes através do micélio dormente ou escleródios misturados a elas (GOULART, 2004). Dessa forma, para reduzir as perdas ocasionadas pela doença em solos infestados de escleródios, o manejo

integrado tornou-se um sistema de apoio para a tomada de decisão quanto à seleção e ao uso de estratégias de controle de doença. Assim, o emprego de sementes saudáveis, tratamento de sementes e manejo baseado na integração dos métodos culturais, químicos e biológicos, pode reduzir a fonte de inóculo na área (MEYER, 2011).

A disseminação de patógenos por meio de sementes é reduzida através do uso de sementes livres de contaminação ou que atendam aos padrões de tolerância determinada para a cultura. No ponto de vista sanitário, sementes livres de quaisquer microrganismos indesejáveis seriam uma semente ideal, porém nem sempre é possível obter tais sementes, uma vez que a qualidade sanitária dos grãos é influenciada pelas condições climáticas em que foram produzidas e armazenadas (GOULART, 1998).

O tratamento de sementes pode ser entendido como qualquer procedimento que envolva as sementes, pela incorporação de produtos químicos e/ou biológicos em sua superfície, e/ou pelo uso de agentes físicos, visando à melhoria ou garantia do seu desempenho em condições de cultivo. O tratamento de sementes para o controle de fitopatógenos pode ser realizado através de métodos químicos, físicos, biológicos ou pela combinação destes (ZAMBOLIM, 2004). É uma prática de baixo custo e seu efeito ao ambiente é restrito quando comparado à aplicação de produtos químicos nas plantas (MORAES, 2004).

O tratamento de sementes é uma técnica que auxilia no controle de patógenos transmitidos via sementes e garante uma população adequada de plantas na área, mesmo quando as condições climáticas no momento da semeadura são prejudiciais à germinação e emergência das plântulas, que ficam expostas por um longo período a fungos habitantes do solo que provocam a deterioração das sementes ou morte das plântulas (HENNING, 2004).

O tratamento de sementes com produtos químicos sintéticos ainda é o mais empregado, por ter simplicidade na execução e melhor custo/benefício (SILVA, 2016). Entretanto, a agricultura tem procurado medidas alternativas para o tratamento de sementes e controle de doenças, que proporcionam maior preservação ambiental e melhor qualidade de vida (SANTOS, 2018). Acerca disso, o

uso de substâncias naturais, como os extratos e óleos vegetais, e microrganismos antagonistas a fitopatógenos, como espécies de *Trichoderma* e de *Clonostachys*, apresenta-se como uma alternativa de baixo impacto na agricultura, com menor risco de contaminação do solo.

Os óleos essenciais são compostos orgânicos de estrutura química heterogênea. Tratam-se de misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixa massa molecular, geralmente odorífera e líquida. Os óleos essenciais são obtidos por meio de diferentes processos, dependendo da localização na planta, quantidade e das características exigidas para o produto final. Os processos usuais são destilações por arraste a vapor d'água, expressão de pericarpo ou hidrodestilação (MORAIS, 2009). Os produtos à base de óleos essenciais e extratos vegetais vêm se destacando no meio científico, devido ao seu potencial antimicrobiano de origem natural (GILLES et al., 2010). Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos principalmente de terpenos, porém, há alguns derivados dos fenilpropanoides. De acordo com o tamanho da molécula, os terpenoides recebem denominação diferente: monoterpenos e sesquiterpenos (OOTANI et al., 2013).

Os óleos essenciais possuem compostos secundários, não vitais às plantas, mas com função de proteção contra doenças; ação fungitóxica, ao inibir o desenvolvimento micelial e a germinação de esporos; e ação antimicrobiana indireta pela ativação de mecanismos de defesa nas plantas. Tratam-se de fitoalexinas elaboradas pelos vegetais em resposta aos estresses químicos, biológicos ou físicos; com capacidade em dificultar ou diminuir a atividade de agentes patogênicos (MÉDICE et al., 2007; LIMA et al., 2008; KNAAK; FIUZA, 2010). A propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais deve-se à sua característica lipofílica. A hidrofobicidade do óleo essencial possibilita sua interação com os lipídios da membrana celular, influenciando assim, na permeabilidade da célula e causando alterações em sua estrutura (PIPER et al., 2001).

A eficiência do tratamento com óleos essenciais varia de acordo com os óleos essenciais empregados, a composição destes, a microbiota presente nas sementes e as condições de ambiente. Pesquisas relacionadas ao tratamento de sementes

com óleos essenciais ainda são escassas, mesmo com seu efeito positivo já constatado.

Nguefack et al. (2008) verificaram que óleos essenciais extraídos a partir de capim-limão (*Cymbopogon citratos*), alfavaca (*Ocimum gratissimum*), e tomilho (*Thymus vulgaris*) foram capazes de controlar a infecção de patógenos associados a sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). Os três óleos essenciais controlaram a infecção das sementes com uma eficácia variando de 48% a 100%. Constatou-se também o aumento da capacidade de germinação de sementes tratadas com os óleos em 5 a 13% e um melhor vigor das plântulas originadas de sementes tratadas em relação às sementes não tratadas com os óleos.

Gomes et al. (2016), avaliando o efeito de óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basilica* L.), copaíba (*Copaifera langsdorffii* L.) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) no controle de patógenos em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), nas concentrações de 0; 1; 1,5 e 2 mL. L⁻¹, observaram que os óleos reduziram a incidência de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., presentes nas sementes. No entanto, o óleo de copaíba proporcionou redução na qualidade fisiológica das sementes, quando utilizado na concentração de 2 ml. L⁻¹.

Outra possibilidade de tratamento de sementes, alternativo ao químico, é o controle biológico de sementes, conhecido como microbiolização de sementes. A microbiolização consiste no uso de microrganismos vivos aplicados as sementes para o controle dos fitopatógenos, além de auxiliar no crescimento das plantas, beneficiando na germinação; na emergência e desenvolvimento das plântulas; e na produção de grãos e frutos (DINIZ et al., 2009). Essa técnica é utilizada com o intuito de controlar fitopatógenos causadores de podridões das sementes e raízes, tombamento e morte das plântulas; e patógenos foliares, que têm as sementes como fonte de inóculo (SANTOS, 2014).

O controle biológico tem alta especificidade de controle de fitopatógenos, baixo custo e não agride o meio ambiente. Os mecanismos das interações antagônicas entre microrganismos patogênicos e antagonistas com a planta são divididos em antibiose, com a produção de antibióticos com efeito tóxico ao

patógeno; competição, por espaço e alimento; predação e parasitismo, provocando a morte do patógeno; indução de resistência, através da ação indireta sobre o patógeno, pela produção de moléculas que serão reconhecidas por receptores que se ligam a sítios específicos da planta na membrana plasmática; e hipovirulência, pela transmissão de características de uma linhagem de patógeno menos agressivo ou não patogênico para a patogênica (BETTIOL, 1991). Os agentes de controle biológico podem atuar por um ou mais mecanismos de ação, os quais irão conferir maior estabilidade para o manejo (BETTIOL; GHINI, 2009).

Os tratamentos químicos de sementes com produtos sintéticos podem ser trocados por tratamentos biológicos, assim, proporcionando vantagens econômica, social e ambiental. O biocontrole com antagonistas pode diminuir o número ou a quantidade de aplicações de produtos químicos, além de possuir potencial para eliminar o uso dessa prática, dependendo da severidade, manejo da doença e pelas condições ambientais (POMELLA; RIBEIRO, 2009; HEYDARI; PESSARAKLI, 2010). Os fungos *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea* possuem grande potencial de controle de doenças em plantas, como o mofo branco. Esses antagonistas produzem metabólitos secundários, competem por espaço e nutrientes, e provocam a morte do patógeno ao parasitá-lo. Esses mecanismos são bastante importantes para o biocontrole de *S. sclerotiorum*, pois reduzem o seu crescimento micelial e germinação (BOREL, 2014). Determinados isolados de *Trichoderma* spp. e *C. rosea* possuem capacidade de estimular o crescimento das plantas pela colonização da rizosfera e auxiliar na solubilização de nutrientes perto das raízes, permitindo uma melhor assimilação das substâncias pelas plantas (MENEZES et al., 2007).

O biocontrole de fungos causadores de doenças de plantas com o uso de isolados de *Trichoderma* e *C. rosea* vem sendo cada vez mais empregados.

Guimarães et al. (2014) em trabalhos realizados com tratamento de sementes de feijão com *Trichoderma harzianum* sobre *Cladosporium herbarum*, verificaram que a suspensão dos conídios do *T. harzianum* conseguiu controlar de 67 a 77% do patógenos nas sementes de feijão. Além disso, as sementes tratadas com *T. harzianum* proporcionaram o aumento do comprimento da parte aérea e das raízes das plantas de feijão.

Amaral et al. (2018), ao avaliar 15 isolados de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum*, observaram que grande parte dos isolados de *Trichoderma* conseguiu reduzir entre 56,94 a 70,83% o crescimento micelial do fitopatógeno.

Carvalho et al. (2011), ao estudar o efeito do tratamento de sementes de feijão com *T. harzianum*, verificaram a redução da incidência de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *S. sclerotiorum* nas sementes.

Akrami et al. (2012), ao avaliar o efeito do tratamento de sementes de feijão com *T. harzianum* e *T. asperellum* sobre *Fusarium solani*, observaram uma redução da colonização do patógeno na semente, quando aplicadas suspensões aquosas ou soluções açucaradas contendo conídios isolados, ou misturados dos agentes de biocontrole.

O tratamento de sementes com *C. rosea* ainda é escasso, porém na literatura há relatos do seu potencial de controle contra patógenos causadores de doenças em plantas. Rodriguez et al. (2011) constataram que o filtrado de crescimento de *C. rosea* BAF3874 em meio líquido inibiu o crescimento *S. sclerotiorum*. Além disso, nos experimentos em casa de vegetação, *C. rosea* reduziu o efeito negativo do patógeno no desenvolvimento das plantas de soja e alface e provocaram aumentos significativos no peso da massa seco da parte aérea das culturas.

Molleret al. (2003) observaram que duas aplicações da suspensão de esporos na concentração de 10^8 . mL⁻¹ do isolado IK726 de *C. rosea* foram capazes de reduzir a incidência da podridão da cabeça e folhas do repolho, causada por *Pythium tracheiphilum*.

Teixeira (2018), ao avaliar a capacidade de controle da pinta preta da batateira por cinco isolados de *Clonostachys*, verificou que *C. chloroleuca* e *C. rosea* proporcionaram uma redução de 80% da intensidade da doença pela aplicação foliar preventiva dos antagonistas. Os cinco isolados de *Clonostachys* inibiram de 86 a 100% da germinação dos conídios de *Alternaria solani* após vinte e quatro horas de incubação.

Diante do exposto, o objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito do tratamento de sementes de feijão com os óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta-preta e

com os antagonistas *C. rosea* e *Trichoderma* spp. sobre a incidência de *S. sclerotiorum* e a qualidade fisiológica das sementes tratadas.

CAPÍTULO 1

Tratamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com óleos essenciais para o manejo de *Sclerotinia sclerotiorum*

Resumo

Buscando um método alternativo de controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, a presente pesquisa foi conduzida com o objetivo de verificar o efeito do tratamento de sementes com os óleos essenciais (OEs) de cravo-da-índia e pimenta-preta sobre a incidência do patógeno nas sementes e a qualidade fisiológica das sementes tratadas. Inicialmente, foi avaliada a ação *in vitro* dos óleos essenciais nas concentrações 0,25%, 0,50% e 0,75%, sobre o crescimento micelial da *S. sclerotiorum*. O OE de cravo-da-índia e o fungicida tiofanato metílico + fluazinam promoveram 100% de inibição do desenvolvimento do fungo. O OE de pimenta-preta demonstrou potencial de controle, porém com menor eficiência. Em seguida, as sementes foram tratadas com os OEs, para avaliar seus efeitos na qualidade sanitária e fisiológica das sementes. Sementes tratadas com tiofanato metílico + fluazinam (750 ppm), sementes não inoculadas e sementes inoculadas, ambas sem tratamento, foram incluídas no experimento. A sanidade foi avaliada pelo método do papel filtro. Para avaliar a qualidade fisiológica, foram realizados testes de germinação de vigor (primeira contagem de germinação -PCG, concomitante ao teste de germinação) Para avaliar o efeito do tratamento de sementes no desenvolvimento das plântulas, o índice de velocidade de emergência (IVE) em substrato e o comprimento e massa fresca e seca da parte aérea e radicular das plântulas foram avaliados em casa-de-vegetação. Não houve incidência do patógeno nas sementes tratadas com os OEs e com o fungicida. Não houve diferença entre as sementes inoculadas e não inoculadas, ambas sem tratamento, para todas as variáveis estudadas. Com exceção do OE de cravo a 0,75%, que interferiu negativamente na PCG e germinação, os demais tratamentos não tiveram efeito na qualidade fisiológica das sementes. Nos testes conduzidos em casa de vegetação, o OE de cravo-da-índia foi fitotóxico nas concentrações avaliadas, impedindo a germinação das sementes. O OE de pimenta-preta interferiu negativamente no índice de velocidade de emergência das sementes, porém, à

concentração de 0,75%, proporcionou um desempenho satisfatório do desenvolvimento das plântulas de feijoeiro.

Palavras-chave: Controle alternativo; mofo branco do feijoeiro; patologia de sementes; *Syzygium aromaticum*; *Piper nigrum*.

Abstract

Searching an alternative method for controlling *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds, this research was carried out with the objective of verifying the effect of seed treatment with clove and black pepper essential oils (OE) on the pathogen incidence in the seeds and their physiological quality. Initially, the *in vitro* action of essential oils at concentrations of 0.25%, 0.50% and 0.75% on *S. sclerotiorum* mycelial growth was evaluated. Clove EO and thiophanate methyl + fluazinam fungicide promoted 100% inhibition of the fungus development. Black pepper essential oil showed control potential, but it was less efficient than clove EO. Then, the seeds were treated with EOs in order to evaluate their effects on the seeds sanitary and physiological quality. Seeds treated with thiophanate methyl + fluazinam (750 ppm), untreated uninoculated seeds and untreated inoculated seeds were included in the experiment. Seed sanitary quality was evaluated with blotter test. Aiming to evaluate the seed physiological quality, germination and vigor (first germination count - PCG) tests were carried out. In order to evaluate the seed treatments effect on seedling development, emergence speed index (IVE), root and shoot length, as well as root and shoot fresh and dry mass were studied in greenhouse experiments. There was no pathogen incidence in the seeds treated with essential oils and fungicide. There was no difference between untreated inoculated and untreated uninoculated seeds for all variables studied. Except for clove EO at 0.75%, which negatively interfered with PCG and germination, the other treatments had no effect on the seeds physiological quality. In the greenhouse experiments, clove EO was phytotoxic at the concentrations evaluated, preventing seed germination. Black pepper EO negatively interfered in the seed emergence speed index, however, at a concentration of 0.75%, it provided a satisfactory performance for the bean seedlings development.

Keywords: Alternative control; bean white mold; seed pathology; *Syzygium aromaticum*; *Piper nigrum*.

1.1 Introdução

A ocorrência de doenças na cultura do feijão, principalmente as associadas às sementes, é um dos principais fatores que prejudicam a germinação e qualidade fisiológica dos grãos, interferindo assim, no desenvolvimento do estande inicial das plântulas (WENDLAND; LOBO JUNIOR; FARIA, 2018). As sementes são consideradas veículos eficientes no transporte e disseminação de patógenos a longas distâncias (BOECHAT et al., 2014).

Entre os diversos fitopatógenos de importância epidemiológica que comprometem a qualidade das sementes do feijão, encontra-se o fungo *S. sclerotiorum*, agente causal do mofo branco (GOMES et al., 2017). O mofo branco ocasiona perdas no rendimento da produção, em torno de 50%, podendo ser mais elevada se medidas de controle não forem tomadas (LOBO JUNIOR et al., 2009).

A ocorrência da *S. sclerotiorum* nas sementes se dá na forma de micélio dormente, que se encontra no interior destas, nos cotilédones, que mantém a viabilidade do micélio por um longo tempo, e após a semeadura no campo, sob condições favoráveis do ambiente, retoma a sua atividade metabólica, matando a semente e produzindo novos escleródios que irão se desenvolver na mesma safra (WENDLAND et al., 2016).

O tratamento de sementes em um sentido mais amplo pode ser entendido como qualquer técnica que envolva as sementes, seja ela, por meio da incorporação de produtos sintéticos, físicos, biológicos ou pela combinação deste, e pela utilização de agentes físicos, visando manter ou melhorar a qualidade sanitária das sementes e seu desempenho em condições de cultivo (LEITE et al., 2018; MORAIS, 2009; ZAMBOLIM, 2004). O uso dessa prática é de baixo custo e ocasiona menor impacto ambiental, quando comparado à pulverização de produtos químicos (DIONIZIO et al., 2020; PARISI; MEDINA, 2013).

Embora comprovada a eficiência dos métodos químicos no controle de doenças em plantas, os produtos naturais vêm sendo cada vez mais pesquisados como uma alternativa sustentável para melhorar a proteção das plantas contra os fitopatógenos. Além disso, estes produtos podem diminuir os efeitos negativos do uso dos produtos sintéticos na agricultura, resultando em alimentos de melhor qualidade para o consumidor (PACHECO; VASCONCELOS, 2013). Neste sentido, o uso de substâncias naturais, como os extratos e óleos vegetais surge como uma alternativa de baixo impacto na agricultura.

Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de substâncias voláteis, de baixo peso molecular, líquida, em sua maior parte odorífera e lipofílica (MORAIS; GONÇALVES; BETTIOL, 2009). São originados do metabolismo secundário das plantas e, na sua composição química, são principalmente constituídos de mono- e sesquiterpenos, hidratos de carbonos, alcoóis, cetonas, fenóis, aldeídos e ésteres, componentes esses responsáveis pela atividade antimicrobiana a patógenos (RODRIGUES et al., 2017).

Os extratos vegetais e óleos essenciais são tidos como substâncias não-fitotóxicas e com capacidade de controlar microrganismos fitopatogênicos. A habilidade de controle dos patógenos por esses compostos se dá pela sua ação fungitóxica direta, através da inibição do crescimento micelial e germinação dos esporos, e pela indução de fitoalexinas, por meio de suas propriedades elicitoras (MORAIS; GONÇALVES; BETTIOL, 2009). Além disso, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais devem-se à sua característica lipofílica. A hidrofobicidade do óleo essencial permite uma interação entre o óleo e os lipídios da membrana celular, interferindo na sua permeabilidade e causando alterações em sua estrutura (BIASI; DESCHAMPS, 2009; CUNHA et al., 2015; OOTANI et al., 2013; SILVA, 2014). Em geral, a eficiência do tratamento com óleos essenciais varia de acordo com os óleos essenciais empregados, a composição destes, a concentração utilizada, a microbiota presente nas sementes e as condições de ambiente (ANTUNES; CAVACOB, 2010).

O interesse pelo uso dos óleos essenciais no controle de doenças de plantas tem crescido cada vez mais nos últimos anos, entretanto, diversos estudos se limitam à investigação da ação *in vitro* dos seus componentes sobre o crescimento

micelial e esporulação dos fungos fitopatogênicos. Com relação ao tratamento de sementes com óleos essenciais, os estudos ainda são restritos, embora o seu efeito positivo já tenha sido constatado (FERREIRA et al., 2014; GOMES et al., 2016; LEITE et al., 2018; MATA et al., 2009; MONDEGO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2021).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento alternativo de sementes de feijão com os óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia e pimenta-preta sobre a incidência de *S. sclerotiorum* e a qualidade fisiológica das sementes tratadas.

1.2 Materiais e Métodos

Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Botucatu, SP, no Departamento de Proteção Vegetal.

Obtenção dos isolados de *S. sclerotiorum*, dos óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta-preta e das sementes de *Phaseolus vulgaris* L.

O patógeno foi obtido da coleção do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Embrapa Meio Ambiente de Jaguariúna- SP. Os escleródios do patógeno foram depositados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) contido em placa de Petri, e mantidos em câmara de incubação (BOD) a 25°C, no escuro, por sete dias, para o crescimento micelial do patógeno. Os óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e pimenta-preta (*Piper nigrum*) foram adquiridos da empresa Destilaria Bauru. As sementes de feijão foram obtidas do produtor rural, da região de Piraju.

Efeito *in vitro* de óleos essenciais no desenvolvimento de *S. sclerotiorum*

Para avaliar o efeito *in vitro* dos OEs de cravo-da-índia e pimenta-preta sobre o patógeno, estes foram adicionados, individualmente, ao meio de cultura BDA no momento deste ser vertido em placas de Petri, nas concentrações 0,25%, 0,50% e 0,75%. Após a solidificação do meio, foi depositado no centro das placas de cada tratamento um disco de meio BDA de 0,5 cm contendo micélio do patógeno. Os

tratamentos testemunhas foram constituídos de meio BDA puro e meio BDA acrescido de fungicida à base de tiofanato metílico + fluazinam (750 ppm). As culturas foram incubadas em BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de doze horas, por 24 horas.

O experimento foi realizado duas vezes (Ensaio 1 e 2), nas mesmas condições, sendo conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e sete repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição.

O crescimento micelial foi acompanhado diariamente, considerando-se a última leitura, aos três dias, quando as colônias fúngicas de um mesmo tratamento testemunha atingiram as bordas da placa de Petri (representando o crescimento máximo). Com o auxílio de uma régua, mediu-se o diâmetro das colônias (cm) de todos os tratamentos, em duas posições perpendiculares entre si, sendo considerado o valor médio dessas medidas. Os dados de diâmetro de colônia não apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks a 5% de probabilidade.

Tratamento de sementes de feijoeiro infectadas por *S. sclerotiorum* com óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta-do-reino. Efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes.

Para a obtenção de sementes infectadas por *S. sclerotiorum*, o patógeno foi repicado para placas de Petri com meio de cultura BDA acrescido de manitol, no potencial hídrico de -1,0 MPa (73,77g/L) pela fórmula de Van'tHoff (SALISBURY; ROSS, 1991) e incubado a 25°C . Após sete dias, sementes de feijão previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% por um minuto foram distribuídas sobre a colônia fúngica e mantidas em contato com o inóculo por 24 horas em BOD a 25°C . Foi realizado o mesmo procedimento com sementes de feijão dispostas sobre o meio BDA acrescido de manitol sem a presença do patógeno. Após a inoculação, as sementes foram desinfestadas superficialmente novamente e secas. As sementes inoculadas e sadias foram misturadas, de forma a se obter um lote de trabalho com 20% de infecção.

Para o tratamento das sementes com os OEs de cravo-da-índia e pimenta-preta, estes foram adicionados em água destilada esterilizada acrescida de Tween 80 (1,0mL/L), nas concentrações de 0,25%; 0,50% e 0,75%. As sementes de feijão foram imersas na solução por doze horas e, logo em seguida, dispostas sobre folhas de papel toalha por 24 horas para secagem. Para os tratamentos controle, foram avaliadas 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 doze horas.

Avaliação da sanidade das sementes

Para avaliar a incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes foi utilizado o método do papel filtro (BRASIL, 2009). As sementes foram dispostas em placas de petri contendo três folhas de papel filtro previamente umedecidas em água destilada e incubadas à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente. Após sete dias de incubação, foi avaliada a incidência do patógeno (% de sementes com o fungo) com auxílio de um microscópio estereoscópico. A identificação do patógeno foi comprovada pela confecção de laminas e observação em microscópio ótico comum.

O experimento foi realizado duas vezes (Ensaio 1 e 2), nas mesmas condições, sendo conduzidos no delineamento experimental inteiramente casualizado, com nove tratamentos e sete repetições. A parcela experimental constituída por uma placa de Petri contendo dez sementes de feijão.

Os dados de incidência não apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks a 5% de probabilidade.

Avaliação do potencial fisiológico das sementes

O efeito do tratamento das sementes com os OEs de cravo-da-índia e pimenta-preta sobre o potencial fisiológico das sementes foi avaliado pelos testes de germinação das sementes de feijoeiro e de vigor (primeira contagem de germinação e índice de velocidade de emergência), conforme descrito a seguir.

Germinação e primeira contagem de germinação (PCG): o teste de germinação foi realizado conforme a técnica do rolo de papel (RP), tendo-se o papel de germinação como substrato. As folhas de papel de germinação foram pré-umedecidas com o volume de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso seco das folhas. Cinquenta sementes de feijão foram distribuídas sobre duas folhas e cobertas com uma terceira, sendo embrulhadas em forma de rolos. Os rolos foram colocados dentro de saco plástico esterilizado com álcool a 70% e mantidos em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas aos cinco (primeira contagem de germinação) (NAKAGAWA, 1999) e aos nove (germinação) dias de instalação do teste, computando-se a porcentagem de plântulas normais para cada tratamento (BRASIL, 2009).

Os experimentos de potencial fisiológico das sementes foram realizados duas vezes (Ensaio 1 e 2), nas mesmas condições, sendo conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com nove tratamentos e quatro repetições cada teste. Os dados das duas variáveis apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Índice de velocidade de emergência (IVE): O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em vasos contendo substrato esterilizado, com dez repetições de três sementes por tratamento. Foi contabilizado o número de plântulas normais emergidas até a estabilização da emergência, que ocorreu aos 30 dias da instalação. De acordo com o número de plântulas emergidas, foi calculado o IVE, usando a seguinte fórmula:

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

Onde: E_1, E_2, \dots, E_n = nº de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem. N_1, N_2, \dots, N_n = nº de dias decorridos da semeadura até a primeira, segunda, ..., última contagem (BRASIL, 2009).

O experimento de IVE foi realizado duas vezes (Ensaio 1 e 2), nas mesmas condições, sendo conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com nove tratamentos e dez repetições cada teste. Os dados de IVE

não apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks, a 5% de probabilidade.

Ao final do teste de emergência, foram determinados o comprimento da parte aérea e da raiz, e a massa fresca e seca da parte aérea e raiz das três plantas por parcela, sendo considerados os valores médios destas aferições. Como o OE de cravo-da-índia foi fitotóxico em todas as concentrações, inibindo totalmente a germinação das sementes, as avaliações de comprimento e massa das plântulas foram realizadas considerando-se os outros seis tratamentos descritos anteriormente. Os resultados de comprimento da parte aérea, em ambos os ensaios, e da raiz, no ensaio 1 apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No ensaio 2, os resultados de comprimento radicular não apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks, a 5% de probabilidade. Com relação aos dados de massa, no ensaio 1, os resultados de massa fresca da parte aérea e raiz apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e a análise de variância foi não significativa, e os resultados de massa seca (parte aérea e raiz) não apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, sendo as medianas comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks, a 5% de probabilidade. No ensaio 2, houve normalidade dos dados de massa fresca pelo teste Kolmogorov-Smirnov, sendo as médias da parte aérea comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; para a raiz, nesse ensaio, a análise de variância foi não significativa. Para a massa seca, tanto de parte aérea quanto de raiz, os resultados apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks, a 5% de probabilidade.

1.3 Resultados e Discussão

Efeito *in vitro* de óleos essenciais no desenvolvimento de *S. sclerotiorum*

Os óleos essenciais inibiram o crescimento micelial do patógeno, diferindo da testemunha, em ambos os ensaios (tabela 1). O OE de cravo-da-índia, em todas as concentrações, promoveu a inibição de 100% do crescimento fúngico, nos dois ensaios, tendo o mesmo efeito do fungicida. O OE de pimenta-preta inibiu o

desenvolvimento do patógeno, exceto na concentração de 0,25%, no primeiro ensaio, que não diferiu da testemunha.

Tabela 1 – Ação *in vitro* dos óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia, pimenta preta e fungicida tiofanato metílico + fluazinam sobre o crescimento micelial (em cm) de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tratamentos	Ensaio 1	Ensaio 2
	Mediana (cm)	Mediana (cm)
Testemunha (BDA puro)	8,50 a	8,50 a
OE cravo-da-índia 0,25%	0,00 c	0,00 d
OE cravo-da-índia 0,50%	0,00 c	0,00 d
OE cravo-da-índia 0,75%	0,00 c	0,00 d
OE pimenta preta 0,25%	8,25 a	7,65 bc
OE pimenta preta 0,50%	7,20 b	7,40 c
OE pimenta preta 0,75%	7,13 b	7,95 b
Fungicida	0,00 c	0,00 d

Em cada ensaio (coluna):

a, b, ... - medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks ($P > 0,05$).

A atividade inibitória do OE extraído de espécies da família *Piperaceae* sobre o crescimento micelial de fitopatógenos já foi relatada. Bastos e Albuquerque (2004), ao estudar o efeito do OE de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*) no controle de *Colletotricum musae* em banana, observaram a inibição em 100% do crescimento micelial do patógeno nas concentrações de 100 µg/mL e 150 µg/mL do óleo utilizado. Santos (2018), avaliando o efeito do tratamento de sementes de feijão com OEs de pimenta-preta e cravo-da-índia nas concentrações de 0,25%; 0,50% e 0,75%, verificou a inibição de *Macrophomina phaseolina* em 100% em todas as concentrações adotadas.

A ação antimicrobiana do OE cravo-da-índia sobre fitopatógenos também já foi constatada. Ao avaliar o efeito do OE de cravo-da-índia na concentração de 0,15% sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Rhizoctonia solani*, Costa et al. (2011) verificaram redução do desenvolvimento das colônias dos três fitopatógenos. A atividade antifúngica do OE cravo-da-índia é geralmente atribuída ao eugenol, composto fenólico volátil encontrado majoritariamente neste óleo (WANG et al., 2010) e que interfere na membrana celular do patógeno, danificando-a (GILL; HOLLEY, 2006).

Tratamento de sementes de feijoeiro infectadas por *S. sclerotiorum* com óleos essenciais - efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes

Houve alta incidência do fungo nas sementes não inoculadas não tratadas e nas sementes inoculadas não tratadas nos dois ensaios (Tabela 2), o que sugere que essas sementes já tenham vindo contaminadas do campo. Todos os tratamentos com OE e o tratamento com fungicida foram eficientes na redução da incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes de feijão, diferindo das sementes inoculadas não tratadas e das sementes não inoculadas e não tratadas, em ambos os ensaios. O efeito dos OEs varia com o tipo de óleo essencial utilizado e a sua composição, a microbiota existente nas sementes e as condições ambientais. Montes-Belmont e Carvajal (1998) ao avaliarem os efeitos dos OEs de canela, hortelã-pimenta, manjericão, cravo-da-índia e tomilho na proteção dos grãos de milho nas plantas, observaram efeito benéfico do tratamento dos grãos com os OEs, os quais causaram a inibição total do desenvolvimento de *Aspergillus flavus* nos grãos tratados. Pereira et al. (2016) verificaram a redução da incidência de diferentes fitopatógenos em sementes de aroeira-salsa com a utilização de OE de citronela e menta.

Tabela 2 – Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro tratadas com óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia, pimenta preta e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1	Ensaio 2
	Mediana	Mediana
	(%)	(%)
Sementes Não Inoculadas Não Tratadas	20,0 a	20,0 a
Sementes Inoculadas Não Tratadas	20,0 a	20,0 a
OE cravo-da-índia 0,25%	0,0 b	0,0 b
OE cravo-da-índia 0,50%	0,0 b	0,0 b
OE cravo-da-índia 0,75%	0,0 b	0,0 b
OE pimenta preta 0,25%	0,0 b	0,0 b
OE pimenta preta 0,50%	0,0 b	0,0 b
OE pimenta preta 0,75%	0,0 b	0,0 b
Fungicida	0,0 b	0,0 b

Em cada ensaio (coluna):

a, b, ... – medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks ($P > 0,05$).

Os OEs possuem compostos secundários, não vitais as plantas, mas com ação fungitóxicas, ao inibir o crescimento micelial dos microrganismos patogênicos; e ação antimicrobiana pela ativação de mecanismos de defesa nas plantas (SOUSA, 2010). Os componentes presentes nos OEs com atividades antimicrobianas se devem as suas características lipofílicas que atuam na estrutura celular do patógeno, modificando ou destruindo a célula. Este comportamento se dá pelas características hidrofóbicas dos OEs, que possibilita a sua interação com os lipídios da membrana celular, influenciando assim, a permeabilidade da célula (ADAMS; KUNZ; WEIDENBORNER, 1996; BAKKALI et al., 2008; COSTA et al., 2011; HOYOS et al., 2012; PEREIRA et al., 2011; SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995). Daranco et al. (2015) confirmaram a eficácia da ação antifúngica dos OEs de capim-limão, eucalipto e carqueja sobre a incidência de *Fusarium* spp. em sementes de soja. De acordo com os autores, os OEs possuem grande eficácia na redução de patógenos em sementes de soja, além de proporcionarem um melhor rendimento dos grãos. Os autores mencionam ainda a necessidade de mais pesquisas sobre a interação entre

a composição dos óleos e a sua atividade biocida e fisiológica. Apesar de se conhecer a atividade antimicrobiana dos OEs sobre fitopatógenos, pesquisas utilizando esses produtos no tratamento de sementes e no manejo de fungos habitantes de solo, ainda são escassas (NGUEFACK et al., 2008; NETO et al., 2012).

Com relação à qualidade fisiológica, a inoculação de sementes de feijão com *S. sclerotiorum*, no primeiro ensaio, não interferiu na porcentagem da primeira contagem de germinação (PCG) e na germinação (G) final, entretanto, no segundo ensaio a presença do fungo (sementes inoculadas não tratadas) proporcionou redução no percentual dessas variáveis em comparação à testemunha não inoculada não tratada (Tabela 3). Em geral, os OEs apresentaram desempenho semelhante ao fungicida, exceto para OE de cravo-da-índia a 0,75%, que interferiu negativamente nestas variáveis, quando comparado às sementes não tratadas e àquelas tratadas com fungicida, embora não tenha diferido dos outros tratamentos semelhantes a estes três. Este resultado pode estar associado à alta concentração do óleo, ou a alguma substância presente neste, que impediu o processo de germinação, uma vez que, entre os componentes do OE de cravo-da-índia estão compostos alelopáticos, como o eugenol, (E)-cariofileno, α -Humuleno e acetato de eugenol (GOMES et al., 2018; SILVESTRI et al., 2010). A capacidade herbicida dos óleos voláteis de inibir a germinação das sementes e o crescimento das plântulas é atribuída a um dos seus componentes ou pela ação conjunta dos componentes presentes nos óleos (AN; JOHNSON; LOVETT, 1993; HILLEN et al., 2012).

Tabela 3 – Porcentagem de primeira contagem de germinação (PCG) e germinação (G) de sementes de feijoeiro tratadas com óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia, pimenta preta e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	PCG	G	PCG	G
	%	%	%	%
Sementes Não Inoculadas Não Tratadas	39,0 a	41,0 a	61,5 a	62,5 a
Sementes Inoculadas Não Tratadas	40,0 a	41,5 a	33,5 b	33,5 bc
OE cravo-da-índia 0,25%	23,5 ab	23,5 ab	23,0 bc	23,0 bcd
OE cravo-da-índia 0,50%	21,0 ab	21,0 ab	17,5 bc	17,5cd
OE cravo-da-índia 0,75%	6,0 b	6,0 b	7,5 c	7,5 d
OE pimenta preta 0,25%	25,5 ab	25,5 ab	28,5 bc	28,5 bcd
OE pimenta preta 0,50%	20,0 ab	20,0 ab	33,5 b	33,5 bc
OE pimenta preta 0,75%	18,0 ab	18,0 ab	18,5 bc	18,5 bcd
Fungicida	34,0 a	42,0 a	35,5b	42,0 ab

Em cada ensaio (coluna):

a, b, ... – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$);

O índice de velocidade de emergência de plântulas foi prejudicado pelo tratamento das sementes com os OEs, exceto para o OE de pimenta preta a 0,75% no ensaio 2, que mostrou o mesmo efeito do fungicida, sem diferir das testemunhas (Tabela 4). O OE de cravo-da-índia foi fitotóxico, impedindo a germinação das sementes nas três concentrações, em ambos os ensaios. Este efeito pode estar associado ao composto fenólico eugenol presente nesse OE, que, dependendo da concentração adotada, pode provocar toxicidade em sementes, inibindo a germinação ou o desenvolvimento das plântulas (MIRANDA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011). Santos e Mendes (2021) relataram uma forte ação tóxica do OE de

cravo na germinação das sementes de feijão, ao observarem 96,75% de sementes não germinadas. Nagao et al. (2002) observaram que, com o aumento da concentração do óleo essencial de alecrim-pimenta, houve a inibição do processo germinativo de sementes de alface. De acordo com os autores, esse efeito se deve à alta concentração do óleo ou a alguma substância presente na composição deste que é capaz de impedir o processo germinativo.

Tabela 4 – Índice de velocidade de emergência de plântulas de feijoeiro provenientes de sementes submetidas ao tratamento com óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia, pimenta preta e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1	Ensaio 2
	Mediana	Mediana
Sementes Não Inoculadas Não Tratadas	0,47 a	0,40 a
Sementes Inoculadas Não Tratadas	0,43 a	0,34 a
OE cravo-da-índia 0,25%	0,00 c	0,00 c
OE cravo-da-índia 0,50%	0,00 c	0,00 c
OE cravo-da-índia 0,75%	0,00 c	0,00 c
OE pimenta preta 0,25%	0,20 b	0,18 b
OE pimenta preta 0,50%	0,32 b	0,23 b
OE pimenta preta 0,75%	0,35 b	0,29 a
Fungicida	0,53 a	0,44 a

Em cada ensaio (coluna):

a, b, ...– medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks ($P > 0,05$).

A inibição da germinação de sementes por extratos ou óleos essenciais não ocorre somente pelos seus componentes químicos, mas também pelo potencial osmótico dos óleos ou extratos que estão em contato com as sementes (MAZZAFERA, 2003; WARDLE; NICHOLSON; AHMED, 1992). As substâncias presentes nos OEs podem agir nos processos metabólicos das plantas e sementes, através das características aleloquímicas, podendo inibir ou retardar tanto a germinação das sementes quanto o desenvolvimento das plântulas (MAGALHÃES et al., 2014). Os efeitos aleloquímicos irão depender da concentração do OE utilizado e da capacidade de penetração de algumas substâncias presentes neste, que são capazes de inibir, retardar a multiplicação ou o desenvolvimento das células, prejudicando a germinação das sementes (GONZALEZ et al., 2002).

Em geral, o OE de pimenta-preta nas concentrações 0,25% e 0,50% influenciou negativamente o comprimento da parte aérea e radicular. A concentração de 0,75% teve efeito positivo no comprimento radicular, em ambos os ensaios, tendo demonstrando um desempenho similar ao fungicida no segundo ensaio (Tabela 5). O tratamento com fungicida beneficiou o desenvolvimento das plântulas.

Tabela 5 – Comprimento da parte aérea (CPA) e radicular (CPR) de plântulas de feijoeiro provenientes de sementes submetidas ao tratamento com óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia, pimenta preta e fungicida tiofanato metílico +fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	CPA	CPR	CPA	CPR
	(cm) ¹	(cm) ¹	(cm) ¹	(cm) ²
Sementes Não Inoculadas Não Tratadas	11,08 ab	25,52 ab	11,52 ab	27,15 b
Sementes Inoculadas Não Tratadas	11,07 ab	25,77 ab	14,82 a	32,65 a
OE pimenta preta 0,25%	5,53 b	16,75 b	5,27 b	8,25 d
OE pimenta preta 0,50%	6,52 b	19,18 ab	6,95 b	22,80 c
OE pimenta preta 0,75%	10,18 ab	30,68 ab	10,88 ab	34,15 a
Fungicida	14,77 a	36,01 a	14,72 a	32,35 a

Em cada ensaio:

¹a, b, c... –médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

²a, b, c... – medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks (P>0,05)

O óleo essencial de pimenta-preta possui como componentes majoritários: α -piperina, β -piperina, 1- α -felandreno, β -cariofileno e limoneno (PARTHASARATHY et al., 2007), os quais apresentam efeitos alelopáticos sobre as plantas. As ações dos aleloquímicos dos OEs podem variar de acordo com o local onde irá atuar na planta, podendo este causar inibição em uma determinada região ou incrementos em outras (PIRES; OLIVEIRA, 2011).

Com relação à massa fresca e seca das plântulas, o OE de pimenta-preta apresentou o mesmo efeito que o fungicida em todas as concentrações no ensaio 1, comportamento esse que só se repetiu para a concentração 0,75%, no ensaio 2 (Tabela 6).

Tabela 6 – Massa fresca aérea (MFA), massa seca aérea (MSA), massa fresca radicular (MFR) e massa secaradicular (MSR) de plântulas de feijoeiro provenientes de sementes submetidas ao tratamento com óleos essenciais (OE) de cravo-da-índia, pimenta preta e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1				Ensaio 2			
	Mediana (Kg)				Média	Mediana		
	MFA ¹	MSA ²	MFR ¹	MSR ²	MFA ²	MSA ²	MFR ¹	MSR ²
Sementes Não Inoculadas	2,75	0,30 a	5,40	0,25 a	2,55 a	0,30 b	6,05	0,40 a
Sementes Não Tratadas								
Sementes Inoculadas	2,45	0,30 a	5,10	0,30 a	3,18 ab	0,40 a	5,90	0,30 a
Sementes Não Tratadas								
OE pimenta preta 0,25%	1,15	0,11 a	2,35	0,16 a	1,43 b	0,10 c	2,05	0,11 a
OE pimenta preta 0,50%	1,65	0,20 a	3,40	0,20 a	1,77 ab	0,20 c	4,25	0,20 a
OE pimenta preta 0,75%	2,70	0,30 a	5,75	0,40 a	3,17 ab	0,40 a	6,55	0,35 a
Fungicida	3,35	0,40 a	5,10	0,30 a	3,73 a	0,55 a	6,20	0,50 a

Em cada ensaio:

¹Variáveis cujos dados apresentaram normalidade e análise de variância não significativa;

²Variáveis cujos dados não apresentaram normalidade e medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks ($P > 0,05$)

³Variável cujos dados apresentaram normalidade e médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Conforme exposto anteriormente, o OE de cravo mostrou fitotoxicidade nas concentrações adotadas para o tratamento de sementes no experimento de casa de vegetação, de modo que comprimento e massa de plântulas não puderam ser determinados. Os resultados observados nos ensaios *in vitro* e no teste de sanidade comprovam a ação antimicrobiana deste óleo, porém aqueles de qualidade fisiológica não foram satisfatórios. Possivelmente, esse comportamento do OE de cravo-da-índia observado na fase *in vivo* não tenha se repetido, porque, nessas condições, existem multifatores interagindo, dificultando assim a diferenciação dos efeitos do OE. De acordo com Hillen et al. (2012), ainda há necessidade de mais estudos sobre a provável ação tóxica dos óleos essenciais quando aplicados diretamente nas sementes. Para que uma substância seja empregada no tratamento

de sementes, é preciso que a mesma tenha ação efetiva sobre o alvo biológico e que não exerça ação deletéria sobre a planta (CUNHA et al., 2015).

De acordo com Machado (2000), os estudos com OE têm por objetivo desenvolver produtos eficazes e seguros para o tratamento de sementes, além de reduzir os impactos no ambiente resultante da utilização de produtos sintéticos isolados ou em combinação com outras medidas. Apesar disso, as pesquisas com os OEs ainda são bastante recentes e não se tem muitas informações sobre os seus efeitos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram o potencial antifúngico do tratamento das sementes com OE de pimenta-preta no controle de *S. sclerotiorum*, entretanto mais pesquisas são necessárias com relação à viabilidade de aplicação deste óleo. Já OE de cravo-da-índia foi eficiente na inibição do crescimento micelial *in vitro* e na redução da incidência do patógeno nas sementes, porém, mostrou-se tóxico às sementes, inibindo totalmente a germinação destas nos experimentos de casa de vegetação.

Referências

- ADAMS, S.; KUNZ, B.; WEIDENBORNER, M. Mycelial deformations of *Cladosporium herbarum* due to the application of eugenol and carvacrol. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, n.5, p.535-540, 1996.
- AN, M. I. R. J.; JOHNSON, I. R.; LOVETT, J. V. Modelagem matemática de alelopatia: resposta biológica a aleloquímicos e sua interpretação. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.10, p.2379-2388, 1993.
- ANTUNES, M. D. C.; CAVACOB, A. M. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**, v.25, n.5, p.351-366, 2010.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia brasileira**, v.29, n.5, p.555- 557, 2004.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, p. 150-160, 2009.
- BOECHAT, L. T. et al. Detecção do mofo-branco no feijoeiro, utilizando características espectrais. **Revista Ceres**, v.61, n.6, p.907-915, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília, DF: Mapa/ACS, p.395-398, 2009.
- COSTA, A. R. T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.13, n.2, p.240-245, 2011.
- CUNHA, R. P. da et al. Diferentes tratamentos de sementes sobre o desenvolvimento de plantas de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.10, p.1761-1767, 2015.
- CUNHA, A. O. et al. Efeitos de substratos e das dimensões dos recipientes na qualidade das mudas de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC) Standl. **Revista Árvore**, v.29, n.4, p.507-516, 2005.
- DARONCO, M. V. et al. Avaliação da eficácia de óleos essenciais no tratamentos de sementes de soja. **Revista Ciência Agrícola**, v.13, n.1, p.47-52, 2015.
- DIONIZIO, A. F. et al. Avaliação sanitária e fisiológica de sementes de mogno e baru tratadas com captana. **Heringeriana**, v.14, n.1, p.13-20, 2020.
- FERREIRA, E. F. et al. Uso de extratos vegetais no controle *in vitro* do *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. coletado em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.2, p.346-352, 2014.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inibição de ATPases de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* ligadas à membrana por aromáticos de óleo vegetal. **Jornal Internacional de Microbiologia de Alimentos**, v.111, n.2, p.170-174, 2006.

GOMES, R. dos S. S. et al. Caracterização da *Sclerotinia sclerotiorum*, transmissão e qualidade fisiológica em sementes de algodoeiro. **Acta Iguazu**, v.6, n.4, p.105-113, 2017.

GOMES, R. S. S. et al. Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.279-287, 2016.

GOMES, P. R. B. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, v.47, n.1, p.37-52, 2018.

GONÇALVES, E. P. et al. 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.

GONZÁLEZ, R. H.; MEDEROS, D. M.; SOSA, I. H. Efectos alelopáticos de restos de diferentes especies de plantas medicinales sobre la albahaca (*Ocimum basilicum* L) en condiciones de laboratorio. **Revista cubana de plantas medicinales**, v. 7, n. 2, p. sp-sp, 2002.

HILLEN, T. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

HOYOS, J. M. Á. **Alterações ultraestruturais e atividade antifúngica em *Pseudocercospora griseola* e *Colletotrichum lindemuthianum* tratados com óleos essenciais e controle alternativo da antracnose do feijoeiro**. 2012. 125f. Dissertação (mestrado em fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

LEITE, K. et al. Óleos essenciais no tratamento de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. durante o armazenamento. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.13, n.2, p.186-199, 2018.

LOBATO, A. K. da S. et al. 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, n.S2, p.915-917, 2007.

LOBO JUNIOR, M. et al. Uso de cultivares de feijão comum com arquitetura ereta e ciclo precoce para escape do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico**, p. 1-4, 2009.

MACHADO, J. da C. Tratamento de sementes no controle de doenças. **Lavras: Laps/Ufla/Faepe**, v. 13, p. 1- 138, 2000.

MAGALHÃES, C. R. I. et al. Óleos essenciais na emergência de grãos de milho (*Zea mays* L.). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 10, p. 338-349, 2014.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Brazilian Journal of Botany**, v. 26, p. 231-238, 2003.

MATA M, F. et al. Incidência e controle alternativo de patógenos em sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* DC, *Cactaceae*). **Revista brasileira de Biociências**, v.7, n.4, p.327-334, 2009.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alface. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 1783-1798, 2015.

MORAIS, L. A. S. de; GONÇALVES, G. G.; BETTIOL, W. Óleos essenciais no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 17, p. 257-304, 2009.

MORAIS, L. A. S. de. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. 1 ed. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**,p. 139-152, 2009.

MONDEGO, J. M. et al. Controle alternativo da microflora de sementes de *Pseudobombax marginatum* com óleo essencial de copaíba (*Copaifera* sp.). **Bioscience Journal**, v.30, n.2, p.349-355, 2014.

MONTES-BELMONT, R. ; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection** , v. 61, n. 5, pág. 616-619, 1998.

NAGAO, E. O. et al. Efeito do óleo essencial de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham) na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, 2002.

Suplemento 2. Disponível

em:http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/42_046.pdf. Acesso em: 14. Out. 2021.

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, cap. 2, p.1-24, 1999.

NASCIMENTO, J. M. et al. Inibição do crescimento micelial de *Cercospora calendulae* Sacc. por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu-SP, v. 15, n. 4, p. 751-756, 2013.

NASCIMENTO, D. M. do et al. Óleos essenciais no tratamento de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 27, p. 77-90, 2021.

NETO, A. C. A. et al. Óleo essencial de anis na incidência e controle de patógenos em sementes de erva-doce, *Foeniculum vulgare* mill. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 31, 2012.

NGUEFACK, J. et al. Uso de três óleos essenciais como tratamento de sementes contra fungos transmitidos por sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). **American-Eurasian. Journal of Agricultural and Environmental Science, New work** , v. 4, n. 5, p. 554-560, 2008.

OLIVEIRA, J. A. et al. Secagem e armazenamento de sementes de sorgo com alto e baixo teor de tanino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 699-710, 2011.

OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, p.162-174, 2013.

PACHECO, F. P.; VASCONCELOS, H. L. Saúde e segurança do trabalho: agentes químicos e equipamentos de proteção individual utilizados no tratamento e manuseio de sementes tratadas. **Revista Varia Scientia Agrárias** v. 03, n.02, p. 33-54. 2013.

PANSERA, M. R. et al. Controle alternativo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) De Bary causador da podridão de sclerotinia, com óleos essenciais e extratos vegetais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, n. 3, p. 126-133, 2012.

PARISI, J. J. D.; MEDINA, P. F. Tratamento de sementes. **Instituto Agrônomo de Campinas**, p. 1-7, 2013.

PARTHASARATHY, V. et al. Black pepper: botany and horticulture. **Indian Institute of Spices Research**, v. 33, p. 173-266, 2007.

PEREIRA, K. C. et al. Avaliação de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes e mudas de *Schinus molle*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 85, p. 71-78, 2016.

PEREIRA, R. B. et al. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 115-123, 2011.

PIRES, N. de M.; OLIVEIRA, V. Alelopatia. In: OLIVEIRA JR, R. S. de; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba, Brasil: **Omnipax**, p. 95-123, 2011.

RODRIGUES, J. A. et al. A versatilidade no uso de óleos essenciais. In: VIANNA, U. R.; CARVALHO, J. de O.; CARVALHO, J. R. de. **Tópicos especiais em ciência animal VI**, 1 ed., cap. 7, p. 97-108, 2017.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. *Plant stress physiology* IN: SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth, 4 ed., cap. 5 p. 104-109, 1991.

SANTOS, A. M. D.; MENDES, L. **Tratamento de sementes de feijão com óleos essenciais: efeitos na germinação e sanidade**. 2021. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2021.

SANTOS, P. L. dos. **Manejo de *Macrophomina phaseolina* (tassi) goid. em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com óleos essenciais e antagonistas**. 2018. 75f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, Botucatu, 2018.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

- SILVA, M. M. da et al. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão-comum produzidas no norte de Minas Gerais. **Revista Agro Ambiente**, v.8, p.97-103, 2014.
- SILVESTRI, J. D. F. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, p.589-594, 2010.
- SOUSA, A. E. D. de. **Atividade antifúngica de óleos vegetais no controle de podridão-por- *Fusarium* em melão e fusariose em abacaxi**. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, 2010.
- WANG, C. et al. Atividade antifúngica do eugenol contra *Botrytis cinerea*. **Tropical Plant Pathology** , v. 35, p. 137-143, 2010.
- WARDLE, D. A.; NICHOLSON, K. S.; AHMED, M. Comparação dos efeitos osmóticos e alelopáticos de extratos de folhas de gramíneas na germinação de sementes de gramíneas e no alongamento da radícula. **Planta e solo** , v. 140, n. 2, pág. 315-319, 1992.
- WENDLAND, A.; LOBO JUNIOR, M.; FARIA, J. C. de. Manual de Identificação das Principais Doenças do Feijoeiro-Comum. **Embrapa Arroz e Feijão-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 1ª Ed., p. 4-48, 2018.
- WENDLAND, A. et al. 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.
- XAVIER, M. V. A. et al. Viabilidade de sementes de feijão caupi após o tratamento com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 250-254, 2012.
- 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, p.94-94,2004.

CAPÍTULO 2

Manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* com agentes de biocontrole no tratamento de sementes de *Phaseolus vulgaris* L.

Resumo

O feijoeiro-comum é afetado por diversos fitopatógenos, que influenciam não só na qualidade dos grãos, mas também na sua produtividade. Uma das principais doenças da cultura é o mofo branco, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. O controle deste fungo envolve várias medidas integradas, incluindo o tratamento de sementes com microrganismos antagonistas. A pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento de sementes de feijão com os antagonistas *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* spp. sobre a incidência de *S. sclerotiorum* e seu efeito na qualidade fisiológica das sementes tratadas. O experimento foi iniciado por uma etapa *in vitro*, para avaliar a ação dos antagonistas sobre crescimento do patógeno. Os dois antagonistas tiveram efeito inibitório sobre o patógeno, com maior ação supressora de *C. rosea*. Em seguida, foi feito o tratamento de sementes com os antagonistas e o fungicida tiofanato metílico + fluazinam. Sementes inoculadas e sementes não inoculadas, ambas sem tratamento foram incluídas no experimento. A sanidade foi avaliada pelo método do papel filtro. Para avaliar a qualidade fisiológica, foram realizados testes de germinação e vigor (primeira contagem de germinação-PCG). Para avaliar o efeito do tratamento de sementes no desenvolvimento das plântulas, o índice de velocidade de emergência (IVE) em substrato e o comprimento e massa fresca e seca da parte aérea e radicular das plântulas foram avaliados em casa-de-vegetação. Os antagonistas não controlaram o patógeno nas sementes e, de modo geral, o tratamento biológico não interferiu no potencial fisiológico das sementes e no desenvolvimento das plântulas. Conclui-se que apesar do efeito inibitório *in vitro* no desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, os antagonistas não controlaram o patógeno nas sementes, sugerindo a necessidade de ajustes na aplicação do tratamento.

Palavras-chave: Mofo branco do feijoeiro; controle biológico; *Clonostachys rosea*; *Trichoderma* spp.; germinação; vigor.

Abstract

Common bean is affected by several phytopathogens, which influence grains quality and yield. One of the main diseases of this crop is the white mold, which is caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. This fungus control involves several integrated measures, including seed treatment with antagonistic microorganisms. This research aimed to evaluate the effect of bean seed treatment with *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* spp. antagonists on the *S. sclerotiorum* incidence and their effect on the treated seed physiological quality. The experiment started with an *in vitro* phase, in order to evaluate the antagonists action on the pathogen growth. Both antagonists had an inhibitory effect on the pathogen, on which *C. rosea* presented a higher suppressive action. Then, the seeds were treated with antagonists and thiophanate methyl + fluazinam fungicide. Untreated inoculated and untreated uninoculated seeds were included in the experiment. Seed sanitary quality was evaluated with blotter test. Aiming to evaluate the seed physiological quality, germination and vigor (first germination count - PCG) tests were carried out. In order to evaluate the seed treatments effect on seedling development, emergence speed index (IVE), root and shoot length, as well as root and shoot fresh and dry mass were studied in greenhouse experiments. The antagonists did not control the pathogen in the seeds. In general, the biological treatment did not interfere either the seeds physiological quality or in the seedlings development. It was concluded that despite the antagonists *in vitro* inhibitory effect on *S. sclerotiorum* development, they suggesting that adjustments in this treatment application are necessary.

Keywords: Bean white mold; biological control; *Clonostachys rosea*; *Trichoderma* spp.; germination; vigor.

2.1 Introdução

O feijão é considerado a principal fonte de proteína de origem vegetal incluída na dieta do brasileiro. O Brasil é considerado o maior produtor e consumidor de feijão, com produção total, na safra 2019/2020 de 3,22 milhões toneladas (CONAB, 2020). Devido o feijão ser produzido ao longo do ano, a ocorrência de

doenças é um dos principais fatores para a redução da sua produtividade, por provocar a desuniformidade na germinação e perda da qualidade fisiológica das sementes (SAHARAN; MEHTA, 2008). Dentre os fitopatógenos de importância epidemiológica para o cultivo do feijoeiro, destaca-se o fungo *S. sclerotiorum*, agente causal do mofo branco. Esse fungo é um dos mais devastadores e importantes fitopatógenos de plantas (SILVA; MORANDI, 2009).

O controle do mofo branco é considerado difícil em função da ausência de cultivares resistentes e das características de sobrevivência e disseminação do fungo. Devido a essas dificuldades, tornam-se necessárias a adoção de várias medidas de manejo para resultados eficientes e duradouros (JULIATTI et al., 2015). Uma das medidas que pode ser incorporadas com sucesso ao manejo do mofo-branco é o uso de agentes de biocontrole.

O controle biológico se tornou uma alternativa viável, muitas vezes de baixo custo e sustentável. Os mecanismos das interações antagônicas baseiam-se na morte do fitopatógeno, através da competição, antibiose e parasitismo. Os agentes de controle biológico podem atuar por um ou mais mecanismos de ação, os quais irão conferir maior estabilidade para o manejo (HANDELSMAN; STABB, 1996; LIMA; MARCO; FELIX, 2000; MESQUITA et al., 2017). Nessa perspectiva, os microrganismos antagônicos são alternativas promissoras para o controle de *S. sclerotiorum*, além de poder, substituir ou reduzir o uso de produtos químicos nas lavouras (ALVES et al., 2020). O manejo de *S. sclerotiorum* por fungos antagonistas é relatado na literatura e muitos produtos comerciais à base de fungos são comercializados para esse fim, como Clonosnat®, Clonotri®, EndoFine®, dentre outros à base de *Clonostachys rosea*, e Trichodermil®, Trichodel®, Trichol®, entre outros, formulados com *Trichoderma* spp. (BETTIOL et al., 2012). Além disso, *C. rosea* e várias espécies de *Trichoderma*, quando associadas às plantas, estimulam o crescimento vegetal, pela colonização da rizosfera (GAVA; MENEZES, 2012), melhora a solubilização de nutrientes ao redor das raízes, facilitando a assimilação de substâncias e água pelas plantas (MENEZES et al., 2007).

Pesquisas relacionadas ao tratamento de sementes com agentes de biocontrole, principalmente com *C. rosea*, ainda são escassas, embora esse antagonista já tenha demonstrado o seu potencial no controle de patógenos

(SARAIVA et al., 2014). Os estudos envolvendo isolados de *Trichoderma* para o controle de *S. sclerotiorum* têm aumentado significativamente, devido em alguns casos, ter capacidade de inibir o crescimento do fungo e pela sua habilidade de estimular o desenvolvimento das plantas (RESENDE et al., 2004; BROETTO et al., 2014).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento biológico de sementes de feijão com os antagonistas *C. rosea* e *Trichoderma* spp. sobre a incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes e a qualidade fisiológica das sementes tratadas.

2.2 Material e Métodos

Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Botucatu, SP, no Departamento de Proteção Vegetal.

Obtenção dos isolados de *S.sclerotiorum*, *C. rosea*, *Trichoderma* spp., e das sementes de *Phaseolus vulgaris* L.

O patógeno e os antagonistas foram obtidos da coleção do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Embrapa Meio Ambiente de Jaguariúna- SP. Os escleródios do patógeno foram depositados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) contido em placa de Petrie mantidos em câmara de incubação (BOD) a 25°C, no escuro, por sete dias, para o crescimento micelial do patógeno. Os antagonistas foram reativados em meio de cultura BDA e mantidos em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. As sementes de feijão foram obtidas do produtor rural, da região de Piraju. Sementes estas, não receberam nenhum tipo de tratamento.

Antagonismo de *C. rosea* e *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum* via pareamento, *in vitro*

O teste de antagonismo *in vitro* foi baseado no método de confronto direto proposto por Dennis e Webster (1971), no qual discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro foram retirados das colônias de sete dias de idade, tanto do patógeno quanto dos antagonistas, e dispostos em sentidos opostos em placa de Petri

contendo meio BDA, a 0,5 cm da borda das placas. Três tratamentos foram incluídos para fins de comparação da atividade antagonista: apenas *S. sclerotiorum*, apenas *C. rosea*, e apenas *Trichoderma* spp., sendo depositados, em cada tratamento, apenas um disco de 0,5 cm de diâmetro com crescimento fúngico no centro das placas contendo BDA. As placas foram mantidas por cinco dias em BOD, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

O experimento foi realizado duas vezes (Ensaio 1 e 2), nas mesmas condições, sendo conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e dez repetições, sendo cada placa de petri considerada uma repetição.

Aos quatorze dias de instalação do teste, o crescimento foi avaliado de acordo com o critério de Bell et al (1982), adaptado por Santos et al. (2012), por meio de escala de notas com valores variando de 1 a 5, onde:

NOTA 1- sobreposição do antagonista, que colonizou toda a superfície do meio.

NOTA 2- sobreposição do antagonista, que colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio.

NOTA 3- Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa de Petri (nenhum domina o outro).

NOTA 4- o patógeno colonizou ao menos 2/3 da superfície do meio, sem sobreposição do antagonista.

NOTA 5- sobreposição do patógeno que colonizou toda a superfície do meio.

Os dados obtidos apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks a 5% de probabilidade.

Preparo da suspensão de *C. rosea* e *Trichoderma* spp.

O inóculo dos isolados de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* spp. foi obtido pelo método de grãos de arroz colonizado proposto por Amusa; Okechukwu; Akinfenwa (2007). Em erlenmeyers de 500 mL, foram adicionados 250g de arroz e 50 mL de água destilada, sendo autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão, por meia hora. Após o resfriamento, em frascos distintos, foram adicionados cinco discos de

meio de cultura contendo as estruturas propagativas do *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* spp. Os erlenmeyers foram colocados em câmara BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de doze horas, para a colonização dos grãos de arroz. Ao terceiro dia após a adição dos discos, os frascos foram agitados diariamente manualmente. Após a colonização total, os grãos de arroz foram triturados com água destilada esterilizada e, com o auxílio de gaze esterilizada, foi feita a separação do arroz e o meio líquido.

Tratamento de sementes de feijoeiro infectadas por *S. sclerotiorum* com *C. rosea* e *Trichoderma* spp. Efeito na qualidade sanitária e fisiológica das sementes.

Para a obtenção de sementes infectadas por *S. sclerotiorum*, o patógeno foi repicado para placas de Petri com meio de cultura BDA acrescido de manitol, no potencial hídrico de $-1,0\text{ MPa}$ ($73,77\text{g/L}$) pela fórmula de Van'tHoff (SALISBURY; ROSS, 1991) e incubado a 25°C . Após sete dias, sementes de feijão previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% por um minuto foram distribuídas sobre a colônia fúngica e mantidas em contato com o inóculo por 24 horas em BOD a 25°C . Foi realizado o mesmo procedimento com sementes de feijão dispostas sobre o meio BDA acrescido de manitol sem a presença do patógeno. Após a inoculação, as sementes foram novamente desinfestadas superficialmente e secas. As sementes inoculadas e sadias foram misturadas, de forma a se obter um lote de trabalho com 20% de infecção.

Para o tratamento biológico das sementes com *C. rosea* e *Trichoderma* spp, as suspensões dos antagonistas foram obtidas pelo método de grãos de arroz colonizados, como descrito anteriormente. As sementes de feijão foram colocadas em frascos de 500 mL (400 sementes por recipiente), aos quais foram acrescentadas, individualmente, as suspensões dos antagonistas (10 mL de cada suspensão para 400 sementes). Os frascos de Duran foram agitados manualmente para uma maior cobertura das sementes. Para os tratamentos controle, foram avaliadas sementes tratadas com o fungicida Certeza®, à base de tiofanato metílico + fluazinam (imersão em solução à concentração de 750ppm); sementes inoculadas e sementes não inoculadas, ambas imersas apenas em água destilada. As

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

Avaliação da sanidade das sementes

Para avaliar a incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes, foi utilizado o método do papel filtro (BRASIL, 2009). As sementes foram dispostas em placas de petri contendo três folhas de papel filtro previamente umedecidas em água destilada e incubadas à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente. Após sete dias de incubação, foi avaliada a incidência do patógeno (% de sementes com o fungo) com auxílio de um microscópio estereoscópico. A identificação do patógeno foi comprovada pela confecção de laminas e observação em microscópio óptico comum.

O experimento foi realizado duas vezes (Ensaio 1 e 2), nas mesmas condições, sendo conduzidos no delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e sete repetições, sendo a parcela experimental constituída por uma placa de Petri contendo dez sementes de feijão.

Os dados de incidência apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks a 5% de probabilidade.

Avaliação do potencial fisiológico das sementes

O efeito do tratamento das sementes de feijão com os fungos antagonistas sobre o potencial fisiológico das sementes foi determinado pelo teste de germinação e através dos testes de vigor: primeira contagem de germinação e índice de velocidade de emergência, conforme descrito a seguir.

Germinação e Primeira contagem de germinação (PCG): Teste realizado conforme a técnica do rolo de papel (RP), tendo-se o papel de germinação como substrato. As folhas de germinação foram pré-umedecidas com o volume de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso seco das folhas. Cinquenta sementes de feijão foram distribuídas sobre duas folhas de germinação, posteriormente cobertas com uma terceira folha e embrulhadas em forma de rolos. Os rolos foram colocados

dentro de saco plástico esterilizado com álcool a 70% e mantidos em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. 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).

O ensaio do potencial fisiológico das sementes foi realizado duas vezes (Ensaio 1 e 2), nas mesmas condições, sendo conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições em cada teste. Para as variáveis cujos resultados não apresentaram normalidade, as medianas foram comparadas Kruskal-Wallis Ranks, a 5% de probabilidade e, quando os dados apresentaram normalidade, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Índice de velocidade de emergência (IVE): O experimento foi conduzido em casa de vegetação em vasos contendo substrato esterilizado, sendo semeadas três sementes por vaso. Foi contabilizado o número de plântulas normais emergidas até a estabilização da emergência, que ocorreu aos trinta dias da instalação. De acordo com o número de plântulas emergidas, foi calculado o IVE, usando a seguinte fórmula:

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

Onde: E_1, E_2, \dots, E_n = nº de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem. N_1, N_2, \dots, N_n = nº de dias decorridos da semeadura até a primeira, segunda, ..., última contagem (BRASIL, 2009).

O experimento de IVE foi realizado duas vezes (Ensaio 1 e 2), nas mesmas condições, sendo conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e dez repetições. A parcela experimental foi constituída por um vaso com três sementes. Os dados de IVE não apresentaram normalidade e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks a 5% de probabilidade.

Ao final do teste de emergência, foram medidos o comprimento da parte aérea e da raiz; massa fresca e seca da parte aérea e raiz das três plantas por

parcela, sendo considerado o valor médio das aferições. Os resultados de comprimento da parte aérea e da raiz apresentaram normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. No ensaio 1, a análise de variância foi significativa e as médias foram comparadas pelo teste de Fisher LSD, a 5% de probabilidade; no ensaio 2, a análise de variância foi não significativa.

2.3 Resultados e Discussão

Efeito *in vitro* de antagonistas sobre *S. sclerotiorum*

No teste de ação *in vitro* dos antagonistas sobre o patógeno, as testemunhas apresentaram o crescimento micelial por toda a placa, comprovando a viabilidade das colônias (Tabela 1). A inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* por *C. rosea* foi superior àquela observada com *Trichoderma* spp., em ambos os ensaios. *C. rosea* é capaz de produzir peptídeos antibióticos, provenientes de seu metabolismo secundário (RODRÍGUEZ et al., 2011), que paralisam o crescimento micelial do fitopatógeno, além de provocar a lise nas células das hifas (VITERBO et al., 2007).

Tabela 1 – Notas (escala de Bell, adaptado por Santos et al. (2012)) atribuídas à ação *in vitro* dos antagonistas *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, avaliadas aos quatorze dias após o pareamento.

Tratamentos	Ensaio 1	Ensaio 2
	Mediana	Mediana
Somente <i>S. sclerotiorum</i>	5,00 a	5,00 a
Somente <i>C. rosea</i>	1,00 d	1,00 d
<i>S. sclerotiorum</i> x <i>C. rosea</i>	3,00 b	3,00 b
Somente <i>Trichoderma</i> spp.	1,00 d	1,00 d
<i>S. sclerotiorum</i> x <i>Trichoderma</i> spp.	2,00 c	2,00 c

Em cada ensaio:

a, b, ...—medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks ($P > 0,05$).

A inibição do crescimento micelial do fitopatógeno é um indicativo da ação antimicrobiana dos antagonistas. Os agentes de controle biológico podem atuar por um ou mais mecanismos de ação, dentre os quais, pode-se citar a antibiose e o

hiperparasitismo. A antibiose é um mecanismo com efeito danoso sobre o patógeno, resultando na redução ou paralisação do crescimento micelial deste (REIS, 2014). Segundo Carvalho (2016), alguns antagonistas inibem o crescimento dos isolados patogênicos pela liberação de substâncias tóxicas, na forma de metabólitos secundários, como antibiótico e enzimas líticas que degradam a parede celular, conseqüentemente, resultando na supressão da doença. Os antagonistas fúngicos também podem parasitar as estruturas do patógeno por meio da penetração das hifas e colonização dessas estruturas. Deste modo, os agentes biológicos atuam diretamente sobre o inóculo do patógeno, reduzindo a severidade da doença. Os organismos antagonistas parasitas de patógenos são denominados de hiperparasitas. Em trabalho com isolados de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum* e *Fusarium solani*, Louzada et al. (2009), através da eletromicrografia de varredura, verificaram a interação entre o antagonista e os patógenos, ao observarem hifas de *Trichoderma* spp. penetrando e se enrolando em hifa de *F. solani* e no aglomerado de hifas de *S. sclerotiorum* sendo parasitados por uma hifa de *Trichoderma* spp.

Por meio da técnica de confronto direto, Ethur (2006) classificou como “eficientes” os isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram notas variando de 2,0 a 2,5 e “muito eficientes” aqueles com notas de 1,0 a 1,5. De acordo com esse critério, o isolado de *Trichoderma* spp. empregado no presente trabalho seria considerado eficiente no controle de *S. sclerotiorum*. *Trichoderma* spp. é capaz de produzir enzimas hidrolíticas, como a quitinase, que degradam a parede celular dos fungos, inibindo assim seu desenvolvimento (GEBAUER, 2020; GRUBER, 2012).

Esse experimento foi conduzido com o objetivo de verificar e comprovar a ação dos antagonistas sobre *S. sclerotiorum*, para serem posteriormente empregados no tratamento das sementes. Os resultados obtidos nos dois ensaios demonstraram o potencial de ação dos antagonistas sobre o patógeno. Costa; Morandi e Silva (2009), ao avaliar a capacidade de três isolados de *Trichoderma* spp. e um isolado de *C. rosea*, utilizando uma suspensão de conídios de 2 mL do filtrado antagônico sobre o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, verificaram a ação inibitória do crescimento micelial do patógeno pelos antagonistas.

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

O tratamento fungicida reduziu a incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes, chegando a controlar o fungo em 100% em ambos os ensaios (tabela 2). O componente fluazinam possui ação protetora, com baixa atividade sistêmica e curativa, constatando atuação direta sobre a respiração do fungo, inibindo a fosforilação oxidativa (MEYER et al., 2018). Batista et al.(2014), ao avaliar a aplicação do fungicida à base de fluazinam + tiofanato metílico, verificaram a eficiência do produto em controlar *S. sclerotiorum* em sementes de soja inoculadas, demonstrando os melhores resultados quando comparados aos demais fungicidas empregados. O tratamento com *Trichoderma* spp. não controlou o patógeno nas sementes, possivelmente devido ao efeito da dosagem empregada no experimento, pois é sabido que *Trichoderma* spp. possui capacidade de produzir metabólitos, como toxinas e enzimas líticas, que ao entrarem em contato com o patógeno, controlam o seu desenvolvimento (MACHADO et al., 2012). Os resultados obtidos no presente experimento discordam dos obtidos por Barreto (2018), que observou a diminuição em 99% da incidência de *Fusarium* spp. nas sementes de feijão-fava tratadas com *Trichoderma* spp. e em 59% com o uso do produto Trichodel[®]. Da mesma maneira, Carvalho et al. (2011b) observaram redução em até 51% da incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* nas sementes de feijão tratadas com *Trichoderma* spp.. Em ambos os ensaios do presente trabalho, as sementes tratadas com *C. rosea* apresentaram a maior incidência do patógeno, muito superior àquela observada nas sementes inoculadas. O efeito negativo do *C. rosea* sobre a incidência de *S. sclerotiorum* nas sementes pode estar correlacionada com a quantidade de esporos viáveis na inoculação ou com a eficiência do isolado. Carvalho et al. (2011b) enfatizaram que, ainda que o efeito negativo com o uso de antagonista seja raro, quando ocorrem, estes podem estar relacionados com a concentração ou o isolado utilizados.

Tabela 2 – Incidência (%) de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro tratadas com *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* spp. e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1	Ensaio 2
	Mediana	Mediana
Sementes não inoculadas não tratadas	0,00 c	20,00 b
Sementes inoculadas não tratadas	20,00 b	20,00 b
Sementes tratadas com <i>C. rosea</i>	100,00 a	100,00 a
Sementes tratadas com <i>Trichoderma</i> spp.	20,00 b	20,00 b
Sementes tratadas com Fungicida	0,00 c	0,00 c

Em cada ensaio:

a, b, c... - medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$);

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para germinação e primeira contagem da germinação (PCG) das sementes de feijão no ensaio 1 (tabela 3). No ensaio 2, verificou-se diferença apenas na germinação das sementes tratadas com *C. rosea* e sementes não inoculadas não tratadas, tendo o antagonista proporcionado menor germinação que esta testemunha. Assim, infere-se que *C. rosea* produz diversos compostos e enzimas fitotóxicas no controle do patógeno (GEBAUER, 2020), e alguma dessas substâncias liberadas pelo tempo de inoculação pode ter ocasionado a redução da germinação das sementes de feijão. Os demais tratamentos não diferiram destes e entre si. Os tratamentos de sementes com fungicida e *Trichoderma* spp. não interferiram no potencial de germinação e primeira contagem de germinação das plântulas de feijão. Rezende (2011), avaliando a eficiência de diferentes produtos à base de *Trichoderma* spp. no controle da podridão branca da haste da soja, verificou que os tratamentos com *Trichoderma* spp. e com fungicida à base de fluazinam não interferiram no vigor e germinação das sementes de soja.

Tabela 3 - Primeira contagem de germinação (PCG) e germinação (G) de sementes de feijoeiro tratadas com *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* spp.e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	PCG	G	PCG	G
	Mediana ¹	Mediana ²	Média ³	Média ³
Sementes não inoculadas não tratadas	41,0	41,0 a	61,5 a'	62,5 a
Sementes inoculadas não tratadas	39,0	41,0 a	33,5 ab	33,5 ab
Sementes tratadas com <i>C. Rosea</i>	26,0	28,0 a	24,0 b	25,0 b
Sementes tratadas com <i>Trichoderma</i> spp.	32,0	33,0 a	31,0 ab	32,5 ab
Sementes tratadas com Fungicida	37,0	43,0 a	35,5 ab	42,0 ab

Em cada ensaio:

¹análise de variância não significativa

²a, b, c... – medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks ($P>0,05$)

³a, b, ... – médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$);

Com relação ao índice de velocidade de emergência (IVE), não houve diferença significativa entre os tratamentos nos dois ensaios (tabela 4). O tratamento biológico e o químico não interferiram no índice de velocidade de emergência das plântulas. Conforme Melo (1996) e Bortolin et al. (2019), a capacidade dos agentes de biocontrole em proporcionar benefícios no processo de germinação das sementes e emergência das plantas está relacionada com a produção de hormônios e vitaminas, bem como a conversão de nutrientes minerais úteis as plantas. Lustosa et al. (2020), ao avaliarem o efeito da microbiolização das sementes com *Trichoderma* spp. na qualidade fisiológica e no desenvolvimento de mudas de mogno africano, verificaram que não houve influência do tratamento das sementes sobre o IVE. De acordo com os autores, os resultados obtidos foram positivos, uma vez que o uso de *Trichoderma* spp. na semente proporcionou aumentos na altura e no número de folíolos das plantas de mogno africano.

Tabela 4 – Índice de velocidade de emergência de plântulas de feijoeiro provenientes de sementes submetidas ao tratamento com *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* spp.e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Mediana	
	Ensaio 1	Ensaio 2
Sementes não inoculadas não tratadas	0,55 a	0,45 a
Sementes inoculadas não tratadas	0,38 a	0,52 a
Sementes tratadas com <i>C. Rosea</i>	0,40 a	0,34 a
Sementes tratadas com <i>Trichoderma</i> spp.	0,40 a	0,42 a
Sementes tratadas com Fungicida	0,53 a	0,40 a

Em cada ensaio:

a– medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Ranks ($P>0,05$).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao comprimento radicular no ensaio 1 e 2. Com relação ao comprimento da parte aérea das plântulas no ensaio 1, não houve diferença estatística entre os tratamentos com fungicida e *C. rosea*, entretanto, estes tratamentos diferiram das testemunhas e do tratamento com *Trichoderma* spp. (tabela 5). Quanto à massa fresca e seca da parte aérea e da raiz não houve diferença significativa entre os tratamentos (tabela 6). De acordo com Carvalho et al. (2011b) o não incremento no crescimento das plantas pela aplicação de antagonistas, pode estar associado a dose utilizada; o próprio isolado e seu comportamento no solo/substrato; e com o fitopatógeno. Mertz; Henning e Zimmer (2009), ao avaliarem a eficácia do tratamento de sementes de soja com bioprotetores e fungicidas químicos na sanidade de sementes e emergência de plantas, não verificaram diferença estatística na estatura de plantas originadas de sementes tratadas com Biotrich[®] (*Trichoderma* spp.), *Bacillus pumiluse* os fungicidas carbendazin + thiram, carboxin + thiram e difenoconazole + metalaxyl. No presente estudo, o tratamento de sementes com o *C. roseae* *Trichoderma* spp. não proporcionaram aumento no desenvolvimento das plântulas, conforme observado também por Hoyos-Carvajal; Orduz e Bisset (2009), ao analisar o efeito de sete isolados de *T. harzianum* sobre o crescimento de plântulas de feijão, e por Carvalho et al. (2011a), ao avaliar cinco isolados de *T.harzianum* no manejo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* nas sementes.

Tabela 5 – Comprimento da parte aérea (CPA) e radicular (CPR) de plântulas de feijoeiro provenientes de sementes submetidas ao tratamento com *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* spp.e fungicida tiofanato metílico + fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	CPA ¹ (cm)	CPR ¹ (cm)	CPA ² (cm)	CPR ² (cm)
Sementes Não Inoculadas Não Tratadas	11,08 b	25,52 a	11,52	26,65
Sementes Inoculadas Não Tratadas	11,07 b	25,77 a	14,80	29,58
Sementes tratadas com <i>C. rosea</i>	14,47 a	33,83 a	12,68	30,82
Sementes tratadas com <i>Trichoderma</i> spp.	10,52 b	27,93 a	14,70	34,33
Sementes tratadas com Fungicida	14,43 a	35,67 a	14,68	29,35

Em cada ensaio:

¹variáveis cujos resultados apresentaram normalidade em médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher LSD ($P > 0,05$);

²variáveis cujos resultados apresentaram normalidade e a análise de variância foi não significativa

Conforme observado nas tabelas 3, 4, 5 e 6, os antagonistas não interferiram no desenvolvimento das plântulas, nem positivamente, nem negativamente. O comportamento dos antagonistas foi diferente do observado por Rezende (2011), que descreveu que esses antagonistas exercem efeito sobre o desenvolvimento de plântulas pela produção de fitohormônios reguladores de crescimento, como as auxinas, giberelinas, citocininas e etileno, que favorecem o aumento do índice de velocidade de germinação das sementes e acúmulo de massa seca de parte aérea das plantas.

Tabela 6 – Massa fresca aérea (MFA), Massa seca aérea (MSA), massa fresca radicular (MFR) e massa seca radicular (MSR) de plântulas de feijoeiro provenientes de sementes submetidas ao tratamento com *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* spp. e fungicida tiofanato metílico +fluazinam.

Tratamentos	Ensaio 1				Ensaio 2			
	MFA ¹ (g)	MSA ¹ (g)	MFR ¹ (g)	MSR ¹ (g)	MFA ¹ (g)	MSA ² (g)	MFR ¹ (g)	MSR ¹ (g)
Sementes Não Inoculadas Não Tratadas	2,67	0,32	5,25	0,28	2,55	0,30 a ¹	5,34	0,37
Sementes Inoculadas Não Tratadas	2,55	0,30	5,30	0,33	3,17	0,40 a	5,78	0,33
Sementes tratadas com <i>C. Rosea</i>	3,27	0,42	5,27	0,38	2,65	0,35 a	5,30	0,35
Sementes tratadas com <i>Trichoderma</i> spp.	3,02	0,35	5,03	0,37	3,63	0,45 a	5,77	0,33
Sementes tratadas com Fungicida	3,13	0,42	5,10	0,30	3,65	0,60 a	6,25	0,47

Em cada ensaio:

¹variáveis cujos resultados apresentaram normalidade e a análise de variância foi não significativa

²variável cujos resultados não apresentaram normalidade e medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$);

Para o tratamento com agentes de biocontrole ser considerado um método viável, é preciso que estes consigam controlar os possíveis fitopatógenos associados às sementes, além de não prejudicar o potencial fisiológico das mesmas. Os resultados obtidos neste trabalho revelam o potencial antagonico do *Trichoderma* spp. e *C. rosea* sobre *S. sclerotiorum in vitro*. De maneira geral, pode-se concluir que o tratamento biológico não interferiu no potencial fisiológico das sementes e no desenvolvimento das plântulas. Entretanto, os antagonistas não controlaram o patógeno nas sementes, sugerindo a necessidade de ajustes na aplicação do tratamento.

Referências

- ALVES, H. T. et al. Controle alternativo da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) em frutos de mamão 'Sunrise solo'. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 30331-30346, 2020.
- AMUSA, N. A.; OKECHUKWU, R. U.; AKINFENWA, B. Reactions of cowpea to infection by *Macrophomina phaseolina* isolates from leguminous plants in Nigeria. **African Journal of Agricultural Research**, v.2, p.73-75, 2007.
- BATISTA, T. et al. Controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. **Enciclopédia biosfera**, v. 10, n. 19, 2014.
- BARRETO, G. G. **Caracterização Morfológica de *Fusarium* spp. do Feijão fava e Controle Biológico via Sementes-Plântulas**. 2018. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciamento em Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.
- BAUGH, C. L.; ESCOBAR, B. The genus *Bacillus* and genus *Trichoderma* for agricultural bio-augmentation. **Rice Farm Magazine, Anytown**, v.1, n.4, p.1-4, 2007.
- BELL, D. K. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal Plant Pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p.79-379, 1982.
- BERNARDES, A. **Intensidade do mofo-branco do feijoeiro em função da densidade de plantio e da aplicação de *Trichoderma* spp.** 2005. 40 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2005.
- BORTOLIN, G. S. et al. *Trichoderma* na promoção do desenvolvimento de plantas de *Paspalum regnellii* Mez. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 135-145, 2019.
- BETTIOL, W. et al. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente-Documentos(INFOTECA-E)**, p.1-156, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília, DF: Mapa/ACS, p. 395-398, 2009.
- BROETTO, L. et al. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.13, n.4, p.310-317, 2014.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.822-828, 2011a.
- CARVALHO, D. D. C. et al. 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. 28-34, 2011b.

CARVALHO, J. C. B. de. **Bioprospecção de moléculas bioativas e antagonismo entre *waitea circinata* warcup & talbot e patógenos do arroz**. 2016. 123 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

CONAB –**Histórico Mensal Feijão - Julho/Agosto/Setembro 2020**, Brasília, p.1-4, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-feijao>. Acesso em: 19 jul. 21.

COSTA, L. B.; MORANDI, M. A. B; SILVA, C. E. O. da. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por filtrados de *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea*. In: **Embrapa Meio Ambiente-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 35, fev. 2009. Suplemento. Edição dos Resumos do XXXII Congresso Paulista de Fitopatologia; IV Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos, São Pedro, fev. 2009. Resumo 098., p-1-6, 2009.

DANIEL, J. F. de S.; RODRIGUES FILHO, E. Peptaibols de *Trichoderma*. **Relatórios de produtos naturais**, v. 24, n. 5, pág.1128-1141, 2007.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions Of The British Mycological Society**, v. 57, n. 3, p.363-363, 1971.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 155 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

GAVA, C. A. T.; MENEZES, M. E. L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, p. 633-640, 2012.

GEBAUER, J. T. **Ocorrência natural de *Trichoderma* em Laranjeiras do Sul PR e seu efeito na inibição de fitopatógenos de solo do feijoeiro**. 2020. 75 f. 2020. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2020.

GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology**, v. 158, n. 1, pág. 26-34, 2012.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The plant cell**, v. 8, n. 10, p. 1855, 1996.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Estimulação do crescimento em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) por *Trichoderma*. **Controle biológico**, v. 51, n. 3, p. 409-416, 2009.

JULIATTI, F. C. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* e Mofo branco: Estudos básicos e aplicados. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 23, p. 159-194, 2015.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L. de; FELIX, J. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 2, p. 263-304, 2000.

LOUZADA, G. A. de S. et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota neotropica**, v. 9, p. 145-149, 2009.

LUSTOSA, D. C. et al. *Trichoderma* spp. e seus efeitos na qualidade fisiológica das sementes e no desenvolvimento de mudas de mogno africano. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2020.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brazil: O Fungo e Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, vol. 4, n. 1, p. 261-295, 1996.

MENEZES, M. E. L. et al. Crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2., 2007, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semi-Árido, p. 71- 76, 2007.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v. 39, p. 13-18, 2009.

MESQUITA, D. C. M. et al. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* do feijão comum. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 13, n. 1, p. 1-4, ago. 2017.

MEYER, M. C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2017/18: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Londrina: Embrapa Soja**, Cir. Téc. 140, p. 1-6, 2018.

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, cap. 2, p.1-24, 1999.

NASCIMENTO, J. M. et al. Inibição do crescimento micelial de *Cercospora calendulae* Sacc. por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu-SP, v. 15, n. 4, p. 751-756, 2013.

SARAIVA, R. M. et al. Uso e perspectiva de *Clonostachys rosea* como agente de biocontrole. **Revista de Ciências Agrícolas**, v. 31, n. 1, pág. 78-91, 2014.

REIS, M. T. dos. **Identificação e avaliação do potencial de uso de isolados de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii***. 2014. 117 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

REZENDE, A. A. **Eficiência de Diferentes Produtos Comerciais à Base de *Trichoderma* spp. no Controle da Podridão Branca da Haste da Soja**. 2011. 133f. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Fitopatologia)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

RODRÍGUEZ, M. A. et al. *Clonostachys rosea* BAF3874 como antagonista de *Sclerotinia sclerotiorum*: mecanismos envolvidos e potencial como agente de biocontrole. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 5, p. 1177-1186, 2011.

SILVA, C. E. O. da; MORANDI, M. A. B. Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Coniothyrium minitans*: ensaios preliminares. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 3., 2009, Campinas. Anais... Campinas: ITAL: IAC; Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 1 CD-ROM., p. 1-6, 2009.

RESENDE, M. de L. et al. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 793-798, 2004.

SAHARAN, G. S.; MEHTA, N. *Sclerotinia* diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. **Springer Science & Business Media**, p. 481, 2008.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Plant stress physiology IN: SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth, 4 ed., cap. 5 p. 104-109, 1991.

SANTOS, C. C. et al. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p. 1-5, 2012.

VITERBO, A. D. A. et al. Os 18mer peptaibols de *Trichoderma virens* induzem respostas de defesa da planta. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 6, p. 737-746, 2007.

XUE, A. G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Phytopathology**, v. 93, n. 3, p. 329-335, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento de sementes com produtos químicos ainda é uma medida bastante eficaz e utilizada no manejo de fitopatógenos de sementes. Com o intuito de diminuir os efeitos negativos do uso dos produtos fitossanitários, como a contaminação humana e ambiental, e intensificar a produção de alimentos livres de produtos sintéticos e de melhor qualidade, o controle alternativo vem sendo cada vez mais pesquisado para compor o manejo integrado de doenças de plantas. Acerca disso, o uso de produtos naturais, como os óleos essenciais e de agentes de biocontrole no tratamento de sementes tem sido cada vez mais investigado, constatando-se o efeito positivo no controle de patógenos.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que os óleos essenciais de cravo-da-índia e pimenta-preta têm efeito antifúngico sobre *S. sclerotiorum*, porém, mais estudos são necessários para melhorar a eficiência do tratamento no que diz respeito ao potencial fisiológico. Com relação ao tratamento biológico, apesar do efeito inibitório *in vitro*, os antagonistas não controlaram o patógeno nas sementes, sugerindo a necessidade de ajustes na aplicação do tratamento, uma vez que os efeitos no potencial fisiológico foram satisfatórios.

REFERÊNCIAS

- AKRAMI, M. et al. Effect of seed Treatment with *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* species for controlling *Fusarium* rot of common bean. **Annals of Biological research**, v. 3, n. 5, p. 2187-2189, 2012.
- AMARAL, A. C. T. et al. Biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* por espécies de *Trichoderma* provenientes de sistemas agroflorestais. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 15, n. 2, p. 145-152, 2018.
- BIANCHINI FILHO, A., MARINGONI, A., CARNEIRO, B. S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. F. A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 5 ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, v. 2, p. 376-399, 2016.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE)**, Brasília, p.1-5, 1991.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2009. 341 p.
- BOREL, F. C.. **Interação de *Clonostachys rosea* e *Sclerotinia sclerotiorum* no solo e em plantas de soja e feijão**. 2014. 37 f. Dissertação (Mestrado em Etiologia; Epidemiologia; Controle) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.822-828, 2011.
- CONAB - **Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos**. Safra 2019/20 – décimo segundo levantamento, Brasília, v. 7, p. 31-38, setembro, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos?start=10>. Acesso em: 19 jul. 21.
- CONAB - **Acompanhamento da safra brasileira Grãos**. Safra 2020/21 – quinto levantamento, Brasília, v. 8, p. 43-57, Fevereiro, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> .Acesso em: 19 jul. 21.
- DEBOUCK, D. et al. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. V.; VOYSESR, O. (ed.). Common beans: research for crop improvement. Cali: **CAB International** - CIAT, p. 55-118, 1993.
- DINIZ, K. A. et al. Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micronutrients, aminoacids and plant growth regulators. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 293-297, 2009.
- DHINGRA, O. D. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. 75-112 pp. Em: Zambolin, L. Sementes: Qualidade Fitosanitária. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 2005.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Statistics Division. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
Acesso em: 19 jul. 21.

GILLES, M. et al. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**.v.119, p.731-737, 2010.

GOMES, R. S. S. et al. Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 279-287, 2016.

GÖRGEN, C. A. **Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* 1306** . 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2009.

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-CNPA, p.71-84, 1998.

GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004.

GUIMARÃES, G. R. et al. Supression of seed borne *Cladosporium herbarum* on common bean seed by *Trichoderma harzianum* and promotion of seedling development. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 39, n. 5, p. 401-406, 2014.

HENNING, A. A. Patologia e tratamento de sementes: noções gerais. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 51p.,2005.

HEYDARI, A., PESSARAKLI, M. A review on biological control of fungal plantpathogens using microbial antagonists. **Journal of biological sciences**, v.10, n. 4, p.273–290, 2010.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

LIMA, W. G. et al. Citronella oil inhibits cotton ramulosis in controlled conditions. **Pest Technology**, Canadá, v. 2, n. 1, p.24-27, 2008.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd.& P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 83-90, 2007.

MENEZES, M. E. L. et al. Crescimento de isolados de *Trichoderma* sp. em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, p.71-76, 2007.

MESQUITA, D. C. M. et al. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* do feijão comum. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 13, n. 1, p. 1-4, ago. 2017.

- MEYER, M. C. Manejo de *Sclerotinea sclerotiorum* para a sustentabilidade de produção. In: **Embrapa Soja-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. Informativo Abrates, Londrina, v. 21, n. 3, p. 15, dez. 2011.
- MOLLER, K. et al. Biocontrol of *Pythium tracheiphilum* in chinese cabbage by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, Basingstoke, v.13, n.2, p.171-182, 2003.
- 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, p.99, 2004.
- MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302, ago. 2009. CD-ROM. Suplemento. Trabalho apresentado no 49. Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP., 2009.
- NGUEFACK, J. et al. 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.
- OOTANI, M. A. et al. Utilização de óleos essenciais na agricultura. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 2, p.162-175, 2013.
- PIPER, P. et al. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, v.147, p.2635-2642, 2001.
- POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. da 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.
- REIS, G. F. dos. **Deteção, transmissão e controle de Sclerotinia sclerotiorum associado a sementes de soja**. 2013. 64 f. Tese (Doutorado em Agronomia)– Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2013.
- RODRÍGUEZ, M. A. et al. *Clonostachys rosea* BAF3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 5, p. 1177-1186, 2011.
- 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. 2021.
- SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (ed.). **Feijão**. Universidade Federal de Viçosa, 2. ed., p. 41- 65, 2006.
- SANTOS, P. F. dos. **Aspectos epidemiológicos do mofo-branco e feijão comum**. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

SANTOS, P. L. dos. **Manejo de *Macrophomina phaseolina* (tassi) goid. em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com óleos essenciais e antagonistas.** 2018. 75f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, Botucatu, 2018.

TEIXEIRA, W. D. **Seleção de isolados de *Clonostachys* spp. para o controle da pinta preta da batateira.** 2018. 39 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2018.

WENDLAND, A. et al. 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.

WUTZKI, C. R. **Controle alternativo, biológico e químico do mofo branco na soja.** 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

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, p.94-94, 2004.