

**LUANA DE CARVALHO CATELAN**

**POTENCIAL DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA E ANTAGONISTAS  
NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA VISANDO O CONTROLE DE  
*Colletotrichum truncatum***

**Botucatu  
2025**



**LUANA DE CARVALHO CATELAN**

**POTENCIAL DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA E ANTAGONISTAS  
NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA VISANDO O CONTROLE DE  
*Colletotrichum truncatum***

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Zanin  
Kronka

**Botucatu  
2025**

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C358p | <p>Catelan, Luana de Carvalho</p> <p>Potencial de óleo essencial de cravo-da-índia e antagonistas no tratamento de sementes de soja visando o controle de <i>Colletotrichum truncatum</i> / Luana de Carvalho Catelan. -- Botucatu, 2025</p> <p>72 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu</p> <p>Orientadora: Adriana Zanin Kronka</p> <p>1. Proteção de plantas. 2. Patologia de sementes. 3. Controle alternativo. I. Título.</p> |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

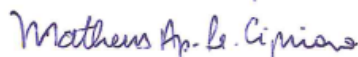
TÍTULO DA TESE:

POTENCIAL DE ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA E ANTAGONISTAS NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA VISANDO O CONTROLE DE *Colletotrichum truncatum*

AUTORA: LUANA DE CARVALHO CATELAN

ORIENTADORA: ADRIANA ZANIN KRONKA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Professora Doutora ADRIANA ZANIN KRONKA (Participação Presencial)  
Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UnespProfessora Doutora RITA DE CÁSSIA PANIZZI (Participação Virtual)  
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - Unesppl Professora Doutora ANA PAULA DE OLIVEIRA AMARAL MELLO (Participação Virtual)  
Departamento de Desenvolvimento Rural / Ufscar - Centro de Ciências Agráriaspl Professor Doutor MATHEUS APARECIDO PEREIRA CIPRIANO (Participação Presencial)  
Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UnespProfessora Doutora PAULA LEITE DOS SANTOS (Participação Presencial)  
do Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - Unesp

Botucatu, 23 de junho de 2025



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida e por me permitir realizar mais um sonho.

Aos meus pais Mauricio e Gilmara, por acreditarem em mim e por apoiarem todos os meus sonhos. Vocês são meu alicerce e tudo o que sou é reflexo do amor e dedicação de vocês. Obrigada por tudo!

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Zanin Kronka pelos ensinamentos, disponibilidade, paciência e compreensão. Sua orientação foi essencial ao meu crescimento pessoal e profissional. Sou grata por ter tido a oportunidade de aprender com você.

As minhas amigas Alana Emanoele, Camile Dutra e amigo Marcos Pedroza, pela parceria e amizade dentro e fora do laboratório. Eu não teria conseguido sem a ajuda de vocês, muito obrigada!

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Márcia Pereira Sartori, pela colaboração na resolução e interpretação da estatística.

Aos funcionários da FCA/UNESP e toda equipe do laboratório de patologia de sementes que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca Lageado, em especial ao Messias, pela colaboração na formatação da Tese.

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



## RESUMO

A soja (*Glycine max*), uma das commodities de maior importância no Brasil e no mundo, é acometida por fitopatógenos que afetam a produtividade e causam prejuízos aos produtores. O fungo *Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose, afeta a cultura em diferentes estádios fenológicos, prejudicando o desenvolvimento da planta e o rendimento da lavoura. O tratamento químico de sementes é prática rotineira na cultura, para diminuir e/ou controlar os danos. Atualmente, há uma busca por moléculas naturais que reduzam os prejuízos causados por produtos químicos ao ambiente e aos seres humanos, sendo o tratamento com produtos alternativos, como óleos essenciais, uma opção promissora. Dessa forma, os objetivos do presente trabalho foram: investigar a ação *in vitro* do óleo essencial (OE) de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre *C. truncatum*; estabelecer uma técnica apropriada para o tratamento de sementes de soja com este OE visando o controle deste patógeno; verificar a ação antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea* sobre o patógeno; e avaliar a integração do OE com estes antagonistas como estratégia de manejo do *C. truncatum*. Foi avaliada a atividade antifúngica *in vitro* do OE de cravo-da-índia, nas concentrações 0,05; 0,10; 0,15 e 0,20%, sobre o crescimento do patógeno. O OE inibiu o crescimento fúngico a partir da concentração 0,10%. Em seguida, visando definir a melhor técnica de aplicação, sementes inoculadas com o patógeno foram tratadas com o OE a 0,10% por meio de imersão e aspersão, sendo a testemunha constituída por sementes inoculadas não tratadas. Foram avaliadas as qualidades sanitária e fisiológica das sementes. Para ambas as técnicas, a germinação das sementes não foi afetada. Houve redução significativa na incidência do fungo, com a técnica de aspersão por 2 e 3 minutos e com imersão por 6 a 9 minutos. Assim, a técnica selecionada foi a de aspersão na concentração de 0,10%. A ação antagonista *in vitro* de *T. harzianum* e *C. rosea* sobre *C. truncatum* foi avaliada pela técnica de confronto direto. Os dois antagonistas inibiram significativamente o patógeno. As sementes foram então tratadas com o OE e com antagonistas, isolados e integrados, sendo os tratamentos assim caracterizados: testemunha (inoculada com o patógeno); OE de cravo-da-índia; OE de cravo-da-índia + *Trichoderma harzianum*; OE de cravo-da-índia + *Clonostachys rosea*; *T. harzianum*; *C. rosea*; e fungicida. Foram avaliadas as qualidades sanitária e fisiológica das sementes. Os tratamentos com *T. harzianum*, isolado e integrado com OE, resultaram em menor vigor e germinação, em relação aos demais. Houve redução significativa na incidência do fungo nas sementes, com exceção do tratamento com OE isolado, que também não diferiu da testemunha. Assim, pode-se concluir que o OE de cravo-da-índia inibe, *in vitro*, o crescimento de *C. truncatum*; O tratamento por aspersão a 0,10% com OE de cravo-da-índia controla o fungo *C. truncatum* em sementes de soja, sem prejudicar o vigor e germinação das mesmas; Os antagonistas *T. harzianum* e *C. rosea* controlam o patógeno *in vitro*; A integração do óleo essencial com os antagonistas reduz a incidência do fungo nas sementes de soja, sendo alternativa promissora ao tratamento químico de sementes.

**Palavras-chave:** tratamento alternativo; *Syzygium aromaticum*; *Trichoderma harzianum*; *Clonostachys rosea*; *Glycine max*.



## ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) is one of the most important commodities in Brazil and worldwide. This crop is affected by phytopathogens that reduce its productivity and cause economic losses to producers. Fungus *Colletotrichum truncatum*, the causal agent of anthracnose, can infect this crop at different phenological stages, impairing plant development and yield. Chemical seed treatment is a common practice in soybean cultivation aiming to reduce and, or to control the damages. Currently, there is an increasing demand for natural molecules that minimize the negative impacts of chemical products on the environment and human health. In this sense, alternative treatments, employing essential oils, represent a promising option. The objectives of the present study were: to investigate the *in vitro* activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil (EO) against *C. truncatum*, to establish an appropriate technique for soybean seeds treatment with this EO aiming the pathogen control, to assess the *in vitro* antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Clonostachys rosea* against the pathogen, and to evaluate the integration of the EO with these antagonists as a management strategy for *C. truncatum*. The *in vitro* antifungal activity of clove EO at concentrations of 0.05%, 0.10%, 0.15%, and 0.20% against pathogen growth was evaluated. The EO inhibited pathogen development from a concentration of 0.10%. Subsequently, in order to determine the most effective application method, seeds inoculated with the pathogen were treated with 0.10% EO via immersion or spraying. The control treatment consisted of inoculated, untreated seeds. Seed health and physiological quality were assessed. Germination was not affected by either application method. Significant reduction in fungal incidence was observed by spraying the seeds for 2 and 3 minutes and by immersing them for 6 to 9 minutes. Therefore, spraying at 0.10% EO was selected as the optimal technique. The *in vitro* antagonistic action of *T. harzianum* and *C. rosea* on *C. truncatum* was evaluated by the direct confrontation technique. Both antagonists significantly inhibited the pathogen growth. Seeds were then treated with EO and with the antagonists, both individually and in combination. The treatments tested were: control (inoculated, untreated seeds), clove EO, clove EO + *T. harzianum*, clove EO + *C. rosea*, *T. harzianum*, *C. rosea* and fungicide. Seed health and physiological quality were also evaluated. Seed treatment with *T. harzianum*, either alone or combined with EO, resulted in lower vigor and germination compared with the other treatments. Fungal incidence in seeds was significantly reduced in all treatments, except for EO alone, which did not differ from the control. In conclusion, clove EO inhibits *C. truncatum in vitro*; spraying soybean seeds with 0.10% clove EO controls *C. truncatum* and doesn't harm vigor or germination; the antagonists *T. harzianum* and *C. rosea* suppress the pathogen *in vitro*; and the integration of EO with these antagonists reduces fungal incidence in soybean seeds, representing a promising alternative to chemical seed treatment.

**Keywords:** alternative treatment; *Syzygium aromaticum*; *Trichoderma harzianum*; *Clonostachys rosea*; *Glycine max*.



## SUMÁRIO

|         |                                                                                                                                              |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | INTRODUÇÃO.....                                                                                                                              | 13 |
| 2       | REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                                                                   | 14 |
| 2.1     | Aspectos gerais da cultura da soja.....                                                                                                      | 14 |
| 2.2     | Antracnose ( <i>Colletotrichum truncatum</i> ).....                                                                                          | 15 |
| 2.3     | Qualidade fisiológica e sanitária de sementes.....                                                                                           | 17 |
| 2.4     | Tratamento de sementes.....                                                                                                                  | 19 |
| 2.4.1   | Tratamento alternativo com óleos essenciais.....                                                                                             | 21 |
| 2.4.1.1 | Cravo-da-índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> ).....                                                                                           | 23 |
| 2.4.2   | Controle biológico por antagonistas.....                                                                                                     | 25 |
| 3       | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                      | 30 |
| 3.1     | Local do experimento.....                                                                                                                    | 30 |
| 3.2     | Obtenção do óleo essencial.....                                                                                                              | 30 |
| 3.3     | Obtenção do isolado de <i>Colletotrichum truncatum</i> .....                                                                                 | 30 |
| 3.4     | Atividade antifúngica do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o crescimento micelial do fitopatógeno <i>Colletotrichum truncatum</i> ..... | 30 |
| 3.5     | Obtenção das sementes de soja.....                                                                                                           | 31 |
| 3.5.1   | Determinação do teor de umidade das sementes.....                                                                                            | 31 |
| 3.5.2   | Obtenção de sementes de soja infectadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> .....                                                            | 32 |
| 3.6     | Tecnologia de aplicação de óleos essenciais no tratamento de sementes de soja visando o controle de <i>Colletotrichum truncatum</i> .....    | 32 |
| 3.6.1   | Avaliação da qualidade sanitária.....                                                                                                        | 33 |
| 3.6.2   | Avaliação da qualidade fisiológica.....                                                                                                      | 33 |
| 3.6.2.1 | Testes de germinação e primeira contagem de germinação.....                                                                                  | 33 |
| 3.6.2.2 | Comprimento e massa seca de plântulas.....                                                                                                   | 34 |
| 3.6.2.3 | Emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação.....                                                       | 34 |
| 3.6.3   | Delineamento experimental e análise estatística.....                                                                                         | 35 |
| 3.7     | Avaliação da integração de tratamentos alternativos de sementes de soja para o controle de <i>Colletotrichum truncatum</i> .....             | 35 |

|       |                                                                                                                                                                         |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7.1 | Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Clonostachys rosea</i> sobre <i>Colletotrichum truncatum</i> .....                                        | 35 |
| 3.7.2 | Tratamento de sementes.....                                                                                                                                             | 37 |
| 3.7.3 | Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes.....                                                                                                        | 38 |
| 3.7.4 | Delineamento experimental e análise estatística.....                                                                                                                    | 38 |
| 4     | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                                                             | 39 |
| 4.1   | Atividade antifúngica do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o crescimento micelial e percentual de inibição de crescimento do <i>Colletotrichum truncatum</i> ..... | 39 |
| 4.2   | Qualidade sanitária de sementes de soja inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> e tratadas com óleo essencial de cravo-da-índia.....                             | 41 |
| 4.3   | Qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com óleo essencial de cravo-da-índia por meio das técnicas de imersão e aspersão.....                                | 43 |
| 4.4   | Antagonismo de <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Clonostachys rosea</i> sobre o fitopatógeno <i>Colletotrichum truncatum</i> .....                                      | 48 |
| 4.5   | Integração de tratamentos alternativos em sementes de soja.....                                                                                                         | 49 |
| 5     | CONCLUSÕES.....                                                                                                                                                         | 55 |
|       | REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                        | 57 |

## 1 INTRODUÇÃO

A soja apresenta extrema importância mundial, sendo uma das culturas mais cultivadas, devido ao seu potencial produtivo e rentabilidade econômica. Constitui-se em matéria prima para diversos setores agropecuários, como na produção do óleo vegetal, o mais consumido pelos brasileiros, e na fabricação de ração para alimentação animal, por conter alto teor de proteína.

Diversos fatores podem reduzir a produtividade da cultura, dentre os quais estão as doenças fúngicas, como a antracnose, que pode ocorrer em qualquer fase do ciclo acarretando em necrose dos tecidos, interferindo no desenvolvimento da cultura, podendo até causar a morte de plântulas. O agente causal da doença, *Colletotrichum truncatum*, pode infectar as sementes, prejudicando a germinação e o desenvolvimento de plântulas.

O controle químico dos fitopatógenos é uma técnica eficiente, com resultados rápidos. Porém, o uso exagerado de produtos sintéticos vem causando diversos problemas, como a resistência de fungos a alguns princípios ativos e o efeito residual, interferindo na microbiota do solo. Dessa forma, é crescente a busca por técnicas alternativas de manejo eficiente dos fitopatógenos associados às sementes, sendo o controle biológico e o controle por meio de produtos naturais, como os óleos essenciais, uma opção diferente dos produtos químicos.

Devido às suas características aromáticas, os óleos essenciais eram comumente utilizados como repelentes a insetos e pragas. Atualmente, estuda-se o efeito dos mesmos no controle de fitopatógenos por meio do tratamento de sementes e aplicação nas plantas. Entretanto a escassez de informações dificulta a padronização das técnicas de aplicação, doses e seu uso combinado com agentes de controle, como antagonistas e compostos químicos.

Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram: investigar a ação *in vitro* do óleo essencial (OE) de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre *C. truncatum*; estabelecer uma técnica apropriada para o tratamento de sementes de soja com este OE visando o controle deste patógeno; verificar a ação antagônica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea* sobre o patógeno; e avaliar a integração do OE com estes antagonistas como estratégia de manejo do *C. truncatum*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais da cultura da soja

A soja (*Glycine max*) é uma das espécies de destaque dentre as leguminosas, sendo uma das principais culturas da produção agrícola mundial e brasileira, devido ao seu potencial produtivo e valor nutritivo, que a torna indispensável para diversos setores econômicos (Fontes, 2019). A temperatura ideal para seu desenvolvimento está entre 20 °C e 30 °C uma vez que regiões que apresentam temperaturas abaixo de 10 °C e acima de 40 °C são impróprias para seu cultivo, pois ocasionam prejuízos à cultura, que são agravados com a ocorrência da escassez hídrica. A cultura é também exigente em água, necessitando em média de 700 mm bem distribuídos no decorrer do ciclo, para que apresente bom desempenho (Seixas *et al.*, 2020). Além disso, a soja é sensível ao fotoperíodo, sendo esta uma característica variável entre as cultivares que determinará o fotoperíodo crítico, acima do qual o florescimento é atrasado. Dessa forma, o grau de resposta ao estímulo fotoperiódico irá determinar a área de adaptação das diferentes cultivares (Purcell, Salmeron e Ashlock, 2014).

É uma herbácea anual que apresenta variabilidade quanto as suas características morfológicas, possui ciclo de desenvolvimento dividido em fases vegetativa e reprodutiva podendo este variar entre 75 e 200 dias, dependendo da cultivar. Possui raiz pivotante e caule constituído de nós e entrenós. No decorrer do desenvolvimento, a planta de soja apresenta três tipos de folhas, sendo elas cotiledonares, unifoliadas e trifoliadas. As flores podem ser brancas ou roxas e a vagem apresenta de cinco a três sementes, dependendo da cultivar (Nogueira *et al.*, 2009).

Considerada uma cultura de importância mundial, os grãos de soja são utilizados por agroindústrias, principalmente na produção de óleo vegetal e de rações para alimentação animal, por serem considerados uma boa alternativa que contém proteína de alta qualidade. Além disso, é utilizada pela indústria química e de alimentos humanos, e vem crescendo seu uso como fonte alternativa de biocombustível (Gouveia *et al.*, 2020). Por ter um mercado consolidado a cultura da soja apresenta alta liquidez, o que a torna economicamente relevante (Vieira Filho, 2024).

A disponibilização de tecnologias ao setor produtivo, como o desenvolvimento de cultivares adaptadas a diferentes regiões, a utilização de manejo cultural adequado e o manejo de pragas e doenças, são os principais responsáveis pelo crescimento da cultura da soja (Freitas, 2011). Entretanto, a soja dispõe de elevado custo de produção, principalmente quanto ao manejo fitossanitário, o que representa um impacto financeiro significativo (Vieira Filho, 2024).

No Brasil, a área de cultivo da oleaginosa na safra 2024/25 foi de 47,6 milhões de hectares, 3% a mais do que na safra anterior. Até o momento foi realizada a colheita de 81,4% da área cultivada e estima-se uma produção de 167.869,8 milhões de toneladas, com incremento de 13,6% em relação à safra 2023/24 e de 7,8% em relação à safra recorde de 2022/23, sendo assim a maior produção de soja já alcançada na história do país. O estado do Mato Grosso é o maior produtor do Brasil e, até o momento, foi registrada uma produção de aproximadamente 50 milhões de toneladas (Conab, 2025).

A produtividade da cultura da soja é fortemente limitada pela incidência de doenças causadas por fitopatógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides, cuja ocorrência varia conforme as condições climáticas de cada ano agrícola (Silva, 2019). A severidade dos danos depende da interação entre a presença de hospedeiros suscetíveis, condições climáticas favoráveis e a presença dos patógenos, sendo estes favorecidos por práticas de manejo inadequadas (Politoski, 2016). Atualmente, já foram identificadas mais de 40 doenças que acometem a cultura da soja no Brasil, número que segue em expansão devido à ampliação da área cultivada e à introdução de novos patógenos nas regiões produtoras (Godoy *et al.*, 2014). Entre os principais fitopatógenos que atacam a soja, estão *Phakopsora pachyrhizi* (Ferrugem asiática), *Cercospora kikuchii* (crestamento foliar), *Colletotrichum truncatum* (antracnose), *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco) e *Macrophomina phaseolina* (mancha carvão) (Grigolli, 2015; Kraemer, 2022).

## **2.2 Antracnose (*Colletotrichum truncatum*)**

A antracnose, cujo agente causal é o fungo *Colletotrichum truncatum*, é uma das principais doenças da cultura da soja que ocorre em todas as áreas de cultivo do mundo e pode resultar em perdas significativas tanto em termos de qualidade quanto quantidade de produção (Reis, Pinto e Lima, 2023).

Essa doença afeta todos os estádios fenológicos da planta, e os sintomas podem ser observados visualmente desde as fases iniciais de desenvolvimento da planta, manifestados na forma de lesões nos cotilédones, na haste e nos ramos, os quais ficam tomados por pontuações escuras (acérvulos) após secarem (Nechet *et al.*, 2018). No período reprodutivo, observam-se o apodrecimento e queda de vagens, abertura de vagens imaturas e germinação precoce de grãos (Henning, 2005). Nas sementes, os sintomas apresentam-se como manchas deprimidas de coloração castanha-escura. Sementes infectadas podem não germinar ou gerar plântulas com sintomas de necrose nos cotilédones, ocasionando o tombamento das mesmas (Henning *et al.*, 2014).

O patógeno caracteriza-se pela formação de acérvulos escuros, com formato oval alongado, apresentando grande quantidade de setas. Possuem conídios unicelulares e curvos, com conidióforos no interior dos acérvulos. Apresenta micélio hialino, septado e ramificado, e apressórios em abundância (Carvalho, 2009; Hyde *et al.*, 2009). O desenvolvimento do patógeno é favorecido por elevadas precipitações e altas temperaturas, entre 25 e 30 °C, e umidade relativa do ar em torno de 80%, porém, o excesso de plantas no cultivo, monocultivo, uso de sementes infestadas, deficiências nutricionais e infestações por percevejos também podem contribuir para o aparecimento do fungo (Dias, Pinheiro e Café-Filho, 2016). No Brasil, a maior incidência e severidade da doença ocorre na região do Cerrado, devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (Seixas *et al.*, 2020). Sob condições favoráveis o patógeno pode causar perdas de até 100% da produtividade, redução do estande de plantas e da qualidade das sementes produzidas. Além disso, sobrevive em restos culturais permanecendo no solo de uma safra para a outra (Oliveira *et al.*, 2021).

O início do ciclo da doença se dá por meio da infecção, quando as hifas penetram nos tecidos das sementes, haste e pecíolo, formando pequenas lesões nos cotilédones. Conforme ocorre o aumento da severidade da doença, as plântulas são atingidas, resultando na morte das mesmas. Além disso, o fitopatógeno pode se estabelecer em mudas infectadas de forma latente, sem o desenvolvimento aparente de sintomas, até que as plantas sejam submetidas a condições favoráveis ao desenvolvimento do fungo (Chattopadhyay, Kolte e Waliyar, 2015).

Embora o fungo possa estar presente em outras plantas hospedeiras, as principais fontes de inóculo são restos culturais e sementes infectadas (Godoy *et al.*,

2016). O patógeno pode associar-se às sementes, alojando-se no interior destas ou aderindo-se à sua superfície, e assim disseminado de forma passiva a grandes distâncias, pelo transporte das sementes (Machado e Cassetari Neto, 2012). A curtas distâncias, a disseminação pode ocorrer através de respingos de água e tráfego de implementos agrícolas na área de cultivo (Souza, 2009). É importante ressaltar que dependendo do clima do local, há a possibilidade de o fungo permanecer em estado latente no interior do tecido cortical da planta, não expressando sintomas até o final do ciclo (Chattopadhyay, Kolte e Waliyar, 2015).

As principais medidas de controle do *C. truncatum* são a utilização de rotação de culturas, tratamento de sementes, controle químico, controle biológico, adequação da população de plantas e manejo adequado do solo (Silva Junior e Behlau, 2018), sendo estas utilizadas em conjunto a fim de impedir a entrada do patógeno na área ou reduzir a quantidade de inóculo já existente, minimizando possíveis danos (Dias, 2014). A utilização de cultivares resistentes é uma medida de controle eficiente e economicamente viável, todavia pouco se sabe sobre cultivares de soja com resistência ao *C. truncatum*. Devido à alta variabilidade genética do patógeno, ampla gama de hospedeiros e facilidade de disseminação via sementes, há uma dificuldade quanto ao desenvolvimento e preservação de genótipos resistentes (Marcelino, 2019).

### **2.3 Qualidade fisiológica e sanitária de sementes**

O uso de sementes de alta qualidade é o principal responsável pelo sucesso da produção agrícola e esta é composta por um conjunto de atributos físicos, genéticos, fisiológicos e sanitários necessários para garantir o estabelecimento de estande uniforme, com desenvolvimento adequado de plântulas e maiores índices de emergência a campo (França Neto, Krzyzanowski e Henning, 2010). Além disso, sementes de alta qualidade geram maior produtividade e, conseqüentemente, rentabilidade financeira ao produtor (Carvalho e Nakagawa, 2012).

A qualidade fisiológica das sementes refere-se à sua capacidade de realizar funções vitais, sendo caracterizada principalmente pela germinação, vigor e longevidade (Ascoli *et al.*, 2018). Dessa forma, realiza-se a análise das sementes com a finalidade de estabelecer a qualidade de um lote e para isso são comumente utilizados os testes de germinação, primeira contagem de germinação, condutividade elétrica, entre outros (Lopes e Nascimento, 2009). A qualidade

fisiológica das sementes de soja é principalmente comprometida pela deterioração em campo, resultante de fatores como danos causados por percevejos, umidade e danos mecânicos durante a colheita (Krzyzanowski, França-Neto e Henning, 2018).

Vigor é caracterizado pela soma das propriedades que determinam o potencial para emergência rápida e uniforme de plântulas normais sob condições adversas. Sua avaliação é fundamental para complementar os resultados do teste de germinação. Sendo assim, quanto maior o vigor da semente, mais rápido será o metabolismo das reservas e o estabelecimento das plantas em diferentes condições ambientais (Marcos Filho, 2015).

A germinação é a capacidade da semente de produzir uma plântula que, pelas características de suas estruturas essenciais, consigam produzir plantas normais sob condições favoráveis (Popinigis, 1985). O teste de germinação diferencia a qualidade entre lotes de sementes, pois com o processo germinativo ocorre o desenvolvimento do eixo embrionário nas sementes explorando, assim, seu potencial máximo (Brasil, 2009b). Entretanto, apenas por meio da avaliação dos testes de vigor, é possível detectar diferenças na qualidade fisiológica de lotes de sementes que apresentem germinação semelhante e comportamentos distintos em condições de campo.

A qualidade sanitária das sementes é estudada devido à influência de fatores bióticos e abióticos, sendo as doenças causadas por microrganismos o principal foco de investigação, por seu potencial em provocar a deterioração das sementes e comprometer significativamente a qualidade das mesmas (Cunha e Ferreira, 2021). Dessa forma, torna-se necessário detectar e manejar corretamente estes patógenos com a finalidade de minimizar os efeitos negativos por estes causados (Carvalho e Nakagawa, 2012).

As sementes são consideradas veículos de agentes fitopatogênicos, pois estes se associam a elas e são levados ao campo, podendo causar redução da germinação e vigor, e originar focos primários de infecção de doenças (Krzyzanowski, França-Neto e Henning, 2018), sendo a condição sanitária de extrema importância. Além disso, estes patógenos podem ser disseminados entre plantas adultas, plântulas e durante o armazenamento de sementes (Machado, 2000).

Os patógenos podem ser detectados nas sementes por meio dos testes de sanidade, como o *Blotter test*, plaqueamento em meio de cultura seletivo e métodos

bioquímicos (Brasil, 2009a). Entretanto, para que os testes de sanidade de sementes sejam eficientes, é necessário conhecer o comportamento dos principais patógenos associados as sementes (Henning, 2005).

Em relação ao manejo sanitário, este pode ser realizado utilizando tecnologias como o tratamento de sementes, manejo da área de plantio e o uso de sementes certificadas (Carvalho e Nakagawa, 2012).

## 2.4 Tratamento de sementes

A expansão da produção de soja, associada ao monocultivo, favoreceu o aumento na incidência de pragas e doenças. Ao atacar a planta, as pragas e doenças reduzem a produtividade da soja, limitando a rentabilidade do agricultor (Garcia *et al.*, 2012). Além disso, o ataque de patógenos pode ocasionar perda da qualidade fisiológica das sementes e redução na germinação e vigor das mesmas. Os fungos *Phomopsis* spp., *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium* spp. e *Cesccospora kikuchii* são os principais patógenos transmitidos via semente de soja e ao infectarem a semente causam prejuízos severos à cultura (Krzyzanowski, França-Neto e Henning, 2018).

Portanto, o tratamento de sementes é utilizado com a finalidade de permitir a germinação de sementes infectadas, protegê-las contra o ataque de fungos de solo e controlar patógenos transmitidos pela semente (Seixas *et al.*, 2020). Basicamente, consiste na aplicação de processos e substâncias que preservem o desempenho das sementes, permitindo a expressão máxima do potencial genético das culturas. O tratamento pode ocorrer por meio da aplicação de produtos químicos, como fungicidas e inseticidas, produtos biológicos, como os à base de *Trichoderma* spp., inoculantes e estimulantes, eficientes contra fitopatógenos (Parisi e Medina, 2013).

Evitar a ressemeadura em decorrência de condições climáticas desfavoráveis é mais um dos benefícios promovidos pelo tratamento de sementes, pois esta técnica tem por objetivo proteger a semente desde a semeadura à germinação, além de evitar a inserção de novos patógenos em áreas livres (Galli, Panizzi e Vieira, 2007).

O tratamento químico é o mais difundido pela sua simplicidade de execução e ótima relação custo-benefício, sendo considerado por muitos autores como uma das medidas mais eficientes no controle de microrganismos transportados pelas sementes (Richetti e Goulart, 2018). Entretanto, para que apresente tal eficiência, os

produtos químicos devem apresentar estabilidade, boa aderência e cobertura uniforme no tegumento das sementes, assim como, serem compatíveis com os demais produtos utilizados no tratamento de sementes (Lucca Filho, 2006).

Como resultado da utilização do tratamento químico, tem-se o desenvolvimento de plantas mais vigorosas, estande uniforme e, conseqüentemente, um aumento significativo na produtividade (Hossen *et al.*, 2014; Menten *et al.*, 2005). Os fungicidas químicos do grupo dos benzimidazóis associados a um fungicida de contato (Thiram), na cultura da soja, garantiram o crescimento de estande adequado de plantas, mesmo com a semeadura coincidindo com períodos de estiagem (Mertz, Henning e Zimmer, 2009).

No mercado de fungicidas existem diversas moléculas químicas que proporcionam o controle eficiente da antracnose na soja. A combinação de Azoxistrobina + Citroconazol, por exemplo, ocasiona uma ação sinérgica atuando em diferentes pontos do metabolismo do patógeno (Gonçalves, 2014). Da mesma forma atuam as moléculas Piraclostrobina + Epoxiconazol (Ferreira-Oliveira *et al.*, 2021) e Trifloxistrobina + Protiocanazol (Bocchi, 2019).

Entretanto, apesar de ser uma tecnologia recomendada, o uso exagerado do tratamento químico com fungicidas tem apresentado eficiência variável, indução de resistência a patógenos e problemas de contaminação ambiental e humana (Reis, Pinto e Lima, 2023). Com o avanço da conscientização ecológica mundial, vem se destacando o uso de produtos biológicos e alternativos como estratégia ao controle químico, visando à preservação da microbiota benéfica e dos inimigos naturais (Migliorini *et al.*, 2012).

O controle biológico resulta da interação antagônica entre microrganismos e agentes de controle biológico, classificados em antibiose, competição e parasitismo (Rezende, Massola Jr. e Bedendo, 2018). O controle por antagonistas ocorre naturalmente no ambiente em equilíbrio, entretanto pode ser menos efetivo em cultivos extensivos. Por este motivo, o controle biológico é realizado por meio da introdução de agentes benéficos, optando por microrganismos que apresentem diferentes mecanismos de ação, mas que atuem de forma conjunta no controle do fitopatógeno (Cruz e Valicente, 2015).

No uso de bioprotetores, destaca-se o gênero *Trichoderma*, que apresenta ampla ação no antagonismo com fungos e bactérias, podendo estimular o crescimento das plantas e promover melhorias na germinação, emergência e vigor

de sementes (Kumar *et al.*, 2023). Entre as vantagens do uso de controle biológico, ressalta-se a possibilidade de sua integração com produtos químicos, o que contribui para atrasar o desenvolvimento de resistência dos patógenos, ao reduzir a pressão de seleção causada pela utilização de um único modo de ação (Ons *et al.*, 2020).

Devido à preocupação ambiental e com a saúde dos trabalhadores, o uso de óleos essenciais e extratos de plantas também vem sendo empregado na agricultura como uma alternativa ao tratamento químico (Gutiérrez *et al.*, 2024).

#### **2.4.1 Tratamento alternativo com óleos essenciais**

Até a metade do século XIX, foram utilizados extratos de plantas para o controle fitossanitário, como, por exemplo, o fumo (nicotina), empregado como inseticida. No decorrer da Segunda Guerra Mundial, grande parte das áreas de cultivo utilizadas como defensivos naturais foi destruída, o que despertou a busca por produtos sintéticos que, mais tarde, substituiriam os naturais (Morais, 2009).

Entretanto, o uso indiscriminado dos produtos sintéticos vem causando problemas cada vez mais sérios ao meio ambiente, consequentemente riscos ao ser humano, e falhas de controle decorrente do surgimento de microrganismos resistentes. Sendo assim, é crescente a busca por produtos que reduzam a contaminação dos solos e os riscos durante o manuseio das sementes tratadas, sem que a qualidade das sementes seja comprometida (Daronco, 2013). Pelo fato de serem biodegradáveis, não persistindo no solo e na água, vem sendo estimulado o uso de óleos essenciais no controle de doenças agrícolas (Nascimento *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário das plantas e são misturas complexas de substâncias voláteis, odoríferas, lipofílicas e solventes em solúveis orgânicos, sendo estes extraídos das partes aromáticas das plantas (Basak e Guha, 2017) e composto por substâncias que apresentam diferentes funções químicas, tais como aldeídos, álcoois, fenóis e cetonas (Sell, 2010). Sua característica principal é a volatilidade, diferente dos óleos fixos que são misturas lipídicas obtidas geralmente de sementes oleaginosas (Biasi e Deschamps, 2009). A composição de um óleo essencial está relacionada à origem da planta, parte utilizada e estágio de desenvolvimento em que esta se encontra ao realizar a extração do óleo, não sendo vinculada apenas à espécie (Besten *et al.*, 2012). Atribui-se seu mecanismo de ação à quantidade e variedade dos compostos

químicos presentes nos óleos essenciais, o que dificulta a escolha de um mecanismo de ação específico para a atividade antimicrobiana (Bonna, 2012).

O tipo de extração do óleo essencial é variável e a escolha do melhor método irá depender das características da planta e das partes da planta de onde este será extraído. Os métodos mais utilizados são arraste a vapor, prensagem mecânica, hidrodestilação e extração por solventes orgânicos, sendo a extração por arraste a vapor mais indicado para óleos essenciais (Castilho, Felisbino e Rodrigues, 2021; Corrêa, Melo e Marques, 2023).

As técnicas de aplicação do óleo essencial para o tratamento de sementes consistem na aplicação direta, por meio de imersão ou pulverização, e na fumigação. Entre os pesquisadores ainda não há um consenso sobre a melhor forma de aplicação e, por este motivo, a maioria dos estudos se baseiam na tecnologia de aplicação e na concentração do óleo essencial (Coelho *et al.*, 2023).

Os principais desafios na aplicação prática dos óleos essenciais estão relacionados a sua instabilidade, como alta volatilidade, rápida degradação e baixa miscibilidade, o que torna necessária a utilização de novas formulações para melhorar sua estabilidade e aumentar sua aplicabilidade (Cadena *et al.*, 2018). Uma das ferramentas utilizadas para o desenvolvimento de produtos à base de substâncias biologicamente ativas é o encapsulamento, onde ocorre a liberação lenta e controlada dessas substâncias (Worrall *et al.*, 2018). O encapsulamento de óleos essenciais em nanopartículas, como as nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNPs), tem se mostrado uma boa alternativa, pois impede a volatilização do óleo essencial, favorecendo estabilidade em um maior período de tempo (Cadena *et al.*, 2018). Entretanto, esta técnica possui custos elevados, o que pode ser um entrave para a produção e consumo em larga escala (Siddiqui *et al.*, 2017).

Os estudos com óleos essenciais limitam-se à descoberta de que estes podem ser utilizados no tratamento de sementes, controlando patógenos sem afetar a germinação. A atividade antifúngica de um óleo essencial pode ser verificada em diferentes fitopatógenos, em função da inibição dos mesmos conforme a concentração utilizada (Zacaroni *et al.*, 2009). Esta ação se dá pela capacidade em se difundir através da parede celular e da membrana plasmática dos fitopatógenos, alterando sua permeabilidade e estrutura (Costa *et al.*, 2011). A verificação da viabilidade do uso dos óleos essenciais os indica como possíveis substitutos aos

fungicidas já utilizados, revelando ainda novas moléculas a serem usadas para a fabricação de novos produtos comerciais (Duke *et al.*, 2010).

Pesquisas têm demonstrado resultados positivos em relação ao uso de óleos essenciais na manutenção da qualidade fisiológica das sementes e no controle de patógenos, seja pela ação fungitóxica direta ou pela indução de resistência ao patógeno. De acordo com Domene *et al.* (2016), o tratamento com os óleos essenciais de *Corymbia citriodora* e *Eucalyptus camaldulensis*, isoladamente, foram capazes de reduzir a incidência dos fungos dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium* em sementes de milho.

Os óleos essenciais de *Hyptis marruboidis*, *Aloysia gratissima* e *Cordia verbenacea* foram eficazes na redução da infecção de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja previamente inoculadas com o patógeno, sendo o óleo de *C. verbenacea* o que apresentou o maior nível de controle (Silva *et al.*, 2012).

Vale ressaltar a importância de avaliar parâmetros que conferem boa germinação das sementes quando colocadas a campo, pois esses compostos vegetais podem interferir nos processos fisiológicos da planta, prejudicando a germinação e o desenvolvimento de plântulas (Biasi e Deschamps, 2009). O tratamento de sementes de feijão-fava com óleos essenciais de citronela, eucalipto, erva-doce e manjerição resultou em uma redução significativa na incidência dos fungos *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp., além de promover o crescimento das raízes das plântulas sem interferir na germinação das sementes, configurando um resultado promissor (Soares *et al.*, 2025). Por outro lado, foi observado que os óleos essenciais de sementes de uva e de melaleuca interferiram negativamente na germinação das sementes de craibeira (*Tabebuia aurea*), embora tenham apresentado efeitos positivos na qualidade fisiológica das sementes de jurema-branca (*Mimosa verrucosa*) (Olinto *et al.*, 2021). Esses resultados reforçam a importância de se estudar os efeitos específicos de cada óleo essencial em diferentes culturas.

#### **2.4.1.1 Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)**

Pertencente à família Myrtaceae, com espécies particularmente ricas em óleos essenciais, o cravo-da-índia é uma árvore perene, com altura de 10 a 12 metros, folhas ovais, opostas, de coloração verde brilhante e com inúmeras glândulas de óleo visíveis contra a luz (Rabêlo, 2010). É a partir dos botões florais e

folhas que ocorre a extração industrial do óleo essencial dessa espécie, utilizado na indústria de cosméticos, como condimentos na culinária, como tratamento de sementes na agricultura, entre outros usos (Lorenzi e Matos, 2002). O cravo-da-índia é originário da Indonésia e, no Brasil, o Estado da Bahia é o que mais produz esta planta para fins comerciais (Affonso *et al.*, 2012).

O eugenol é um composto fenólico volátil presente no óleo de cravo-da-índia que confere aroma e sabor. Quando o óleo essencial é extraído das folhas, o eugenol chega a representar 95% do óleo extraído e, quando este é extraído do botão floral, o eugenol ainda é o principal componente do óleo, com concentrações que variam entre 70 e 85% (Raina *et al.*, 2001). Há outros componentes provenientes da extração do óleo essencial, como acetato de eugenila (15%) e  $\beta$ -cariofileno (5 a 12%), que possuem ação bactericida e anti-inflamatória (Rabêlo, 2010). Além disso, o eugenol apresenta ação bactericida e fungicida. Isso se explica devido à alta capacidade de penetração na membrana que confere a compostos fenólicos, como o eugenol, a atividade antimicrobiana (Affonso *et al.*, 2012).

O óleo essencial de cravo-da-índia apresentou ação antifúngica sobre diferentes espécies de *Fusarium*, inibindo o crescimento do patógeno entre 85% e 100% (Ascensão e Mouchrek Filho, 2013). Da mesma forma, seu uso no tratamento de sementes de café, nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0%, reduziu significativamente a incidência e o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e, na concentração de 1,0%, ainda promoveu aumento no índice de velocidade de emergência e na porcentagem de plântulas normais (Pierre, 2009).

Resultados semelhantes foram observados no tratamento de sementes de milho, onde o óleo essencial de cravo-da-índia, na concentração de 0,2%, reduziu o desenvolvimento dos fungos *Macrophomina phaseolina* e *M. pseudophaseolina* (Lima, 2019).

Os óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela, cidreira e suas combinações inibiram completamente o crescimento micelial dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*, ambos causadores de doenças na cultura da soja (Queiroz *et al.*, 2020). Além disso, a aplicação deste óleo essencial na concentração de 0,1% resultou na inibição total do fungo *Sclerotium rolfsii*, sendo este resultado semelhante ao controle com fungicida (Lima *et al.*, 2022).

### 2.4.2 Controle biológico por antagonistas

De modo geral, o controle biológico é caracterizado pela utilização de um microrganismo que reduza a população de outro microrganismo, podendo este ser usado para diferentes áreas (Bettioli *et al.*, 2022). Pode ocorrer de forma natural, onde a população de agentes benéficos se desenvolve naturalmente no ambiente em equilíbrio, e aplicado, realizado com intervenção humana e caracterizado pela introdução de linhagens selecionadas de antagonistas no ambiente (Cruz e Valicente, 2015). A maioria das pesquisas refere-se ao controle biológico aplicado, onde há uma busca constante pela seleção de antagonistas eficazes e com características desejáveis para o desenvolvimento de produtos (Mello *et al.*, 2020).

O controle biológico ocorre por meio de interações diretas ou indiretas entre agentes benéficos e fitopatógenos (Mello *et al.*, 2020). Fungos e bactérias são os principais microrganismos responsáveis pelo controle de doenças de plantas e estes podem apresentar diferentes mecanismos de ação, como antibiose, competição, indução de resistência, hipovirulência, parasitismo e predação (Medeiros, Bavia e Seixas, 2022). Os mecanismos de ação podem atuar isoladamente ou em conjunto e são influenciados pelas condições ambientais e pela presença de outros microrganismos (Mello *et al.*, 2020).

Uma característica desejável de um potencial antagonista é apresentar mais de um mecanismo de ação, pois assim as chances de sucesso são maiores (Isaias *et al.*, 2014). Entretanto, é necessário que os antagonistas possuam determinada tolerância às moléculas comerciais utilizadas, apresentando compatibilidade com pesticidas e herbicidas químicos (Zambolim, 2005).

Os produtos biológicos podem ser classificados em dois grupos principais, os macrorganismos, que incluem vespas e ácaros predadores, e os biopesticidas, subdivididos em microbianos (fungos, vírus e bactérias) e bioquímicos (extratos de plantas e semioquímicos) (Pomella, 2014). Para o desenvolvimento de novos produtos, é necessário que seja feita a triagem de um grupo de candidatos antagonistas, os quais devem atender a exigências que vão além da eficácia contra o patógeno, como segurança, baixo custo e potencial para alcançar um amplo mercado consumidor (Solino *et al.*, 2017).

Dentre as vantagens do controle biológico, destaca-se a redução dos custos envolvidos na descoberta, desenvolvimento e registro dos produtos, especialmente quando comparados ao processo de criação de um produto químico. Além disso, o

tempo necessário para o lançamento de um biopesticida no mercado tende a ser mais curto (Pomella, 2014).

O Brasil destaca-se como o país que mais aderiu ao controle biológico, ultrapassando a área de 50 milhões de hectares (Bettiol *et al.*, 2022). Durante o ano de 2023, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento registrou 90 produtos de origem biológica, totalizando 616 produtos registrados no país envolvendo microrganismos, macrorganismos, bioquímicos e semioquímicos. Esses dados demonstram a importância dos biopesticidas para o agronegócio brasileiro e a tendência de adoção de tecnologias sustentáveis por agricultores (Embrapa, 2024). Dentre os agentes biológicos disponíveis para comercialização no Brasil, destacam-se bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, além de fungos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Clonostachys rosea* e espécies do gênero *Trichoderma* (Paredes e Lebeis, 2016).

Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os agentes de biocontrole mais estudados e utilizados na agricultura (Lucon, Chaves e Bacilieri, 2014). Apenas 4% das 254 espécies de *Trichoderma* conhecidas são utilizadas no controle biológico. Entre as espécies com potencial para o biocontrole, *Trichoderma harzianum* se destaca no mercado, estando presente em cerca de 40% dos produtos compostos exclusivamente por um microrganismo e em mais de 60% daqueles que contêm uma mistura de fungos, bactérias e micorrizas (Bettiol *et al.*, 2019).

O controle biológico a partir de *Trichoderma* spp. pode ocorrer pela competição por nutrientes, micoparasitismo sobre fungos patogênicos, produção de metabólitos antimicrobianos e fungistáticos, além da ativação dos mecanismos de defesa das plantas (Zeilinger *et al.*, 2016). O micoparasitismo, realizado por algumas espécies de *Trichoderma*, é o principal mecanismo de ação desses agentes biocontroladores. Esse processo é caracterizado pelo crescimento do *Trichoderma* em direção ao fungo patogênico, seguido pelo reconhecimento e interação entre as hifas. Em seguida, há a secreção de enzimas líticas que promovem a degradação da parede celular do patógeno, limitando seu crescimento e desenvolvimento (Steindorff *et al.*, 2012).

O gênero *Trichoderma* atua de diferentes formas nas plantas, desde a proteção contra o ataque de fitopatógenos até o fortalecimento da saúde e das defesas naturais das plantas. Além disso, produzem metabólitos secundários capazes de estimular a resistência das plantas a doenças, favorecer seu

desenvolvimento e aprimorar a eficiência da fotossíntese (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016). Essa adaptabilidade das espécies de *Trichoderma* se dá por meio de seu comportamento oportunista, que lhes confere uma notável habilidade de colonizar a rizosfera das plantas em diferentes tipos de ambientes. Além disso, são capazes de formar estruturas de resistência, como clamidósporos e microescleródios, que garantem sua sobrevivência mesmo em condições desfavoráveis (Monte, Bettiol e Hermosa, 2019).

O uso de cepas de *Trichoderma* também está relacionado ao aumento da tolerância das plantas a estresses abióticos, diminuição da toxicidade causada por pesticidas, herbicidas e biofertilizantes no solo, além de seu potencial como fonte de genes para aplicações em biotecnologia (Nur e Noor, 2020).

Produtos à base de *Trichoderma* utilizados para tratamentos de sementes, aplicação no substrato e/ou pulverização da parte aérea das plantas são eficazes na redução da ocorrência de doenças causadas por patógenos, como *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Sclerotium*, *Macrophomina* e *Crinipellis*, em diferentes culturas, como soja, algodão, feijão, cebola, alho, morango e tomate (Morandi e Bettiol, 2009). Estes produtos podem ser encontrados em diferentes formulações, como grânulos dispersíveis em água, pó molhável e líquidos (esporos em suspensão aquosa) (Lucon; Chaves; Bacilieri, 2014).

A eficiência de *Trichoderma* spp. pode ser observada em diversos estudos. Utilizando diferentes concentrações de *T. harzianum* no tratamento de sementes de algodão, constatou-se a redução dos patógenos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Alternaria* sp., assim como o aumento no percentual de germinação das sementes (Silva *et al.*, 2022). A inoculação de sementes com *T. asperellum* promoveu o aumento de biomassa das culturas de soja, feijão caupi, arroz e milho, o que demonstra sua capacidade de estimular o crescimento de plantas (Chagas *et al.*, 2017). O uso de *T. harzianum* no tratamento de sementes de soja, na dose de 400g 100<sup>-1</sup> kg de sementes, proporcionou a redução dos fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium semitectum*, *Penicillium* sp. e *Colletotrichum truncatum*, além de aumentar a porcentagem de germinação das sementes (Sales *et al.*, 2023). Quando utilizado na dose de 1mL 500<sup>-1</sup> g de sementes, *T. harzianum* se mostrou eficiente quanto a qualidade fisiológica das sementes, proporcionando incremento de 5% em relação à testemunha (Santana e Segato, 2020).

Outro agente de biocontrole que merece destaque é o *Clonostachys rosea*, caracterizado como um saprófita com capacidade endofítica. Este pode ser encontrado em tipos de solo distintos e restos culturais, atua no controle de diversos fitopatógenos, como os fungos *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Sun *et al.*, 2020), e apresenta ação inseticida sobre alguns inseto-pragas, como a *Bemisia tabaci* (mosca-branca) (Mascarin *et al.*, 2022). Sua atividade antagônica se dá pela competição, micoparasitismo, indução de resistência e antibiose (Nygren *et al.*, 2018).

Os metabólitos secundários produzidos pelo *C. rosea* auxiliam na sobrevivência do mesmo, pois, ao interagir com outros microrganismos do solo, inibem o crescimento dos patógenos e favorecem o agente benéfico (Macheleidt *et al.*, 2016). O antagonista produz enzimas capazes de degradar quitina, glucanos e celulose, componentes estruturais da parede celular dos fungos, o que resulta na inibição do seu crescimento (Mamarabadi, Jensen e Lubeck, 2009). Além disso, *C. rosea* pode atuar na promoção do crescimento de plantas (Macedo, 2011).

O tratamento de sementes de cenoura e alho com *Clonostachys rosea* resultou em uma emergência de plântulas mais rápida e uniforme. Além disso, a avaliação da sobrevivência e do estabelecimento do antagonista na rizosfera revelou um aumento significativo de sua população em ambas as culturas estudadas (Bennett e Whipps, 2008). Com a utilização do filtrado de crescimento de *C. rosea* em meio líquido para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, foi observada a inibição completa do desenvolvimento do patógeno, bem como a redução dos efeitos negativos causados por ele no desenvolvimento de plantas de soja e alface cultivadas em casa de vegetação (Rodríguez *et al.*, 2011).

*Clonostachys rosea*, isolado de frutos de goiabeira, reduziu significativamente o crescimento micelial e esporulação de *Colletotrichum* spp. (Fantinel *et al.*, 2023). O isolado obtido no Brasil, NCR61, de *C. rosea* possui eficiência comprovada contra o patógeno *Botrytis cinerea* em morangueiro (Cota *et al.*, 2008) e tomateiro (Borges, Saraiva e Maffia, 2015). Os isolados *Clonostachys chloroleuca* e *C. rosea* ocasionaram uma redução de 80% da intensidade da doença pinta preta da batateira, via aplicação foliar (Teixeira, 2018). Ao inocular diferentes formulações de *C. rosea* (conídios submersos e microescleródios) em frutos de tomate, os autores observaram a redução do patógeno *B. cinerea*, sendo estas técnicas de produção do

antagonista promissoras para o desenvolvimento de novos produtos (Paraíso, Bettiol e Mascarin, 2022).

Diante dos benefícios da utilização de antagonistas no controle biológico e de óleos essenciais como método alternativo para o controle de patógenos causadores de doenças de plantas, torna-se necessária a investigação da viabilidade de integração dos mesmos no tratamento de sementes, visando um controle mais eficiente e com menores impactos ao meio ambiente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local do experimento

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

#### 3.2 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), extraído da folha, foi adquirido na empresa Destilaria Bauru, sendo constituído pelos compostos químicos e respectivas concentrações apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Caracterização química do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)**

| Composto             | Concentração (%) |
|----------------------|------------------|
| Eugenol              | 88,31            |
| Tras-cariofileno     | 7,90             |
| Alfa-humuleno        | 1,58             |
| Tras-calameneno      | 0,38             |
| Óxido de cariofileno | 0,31             |

#### 3.3 Obtenção do isolado de *Colletotrichum truncatum*

O isolado de *Colletotrichum truncatum* utilizado no trabalho foi obtido junto ao Instituto Biológico de São Paulo e conservado pelo método de Castellani (1939), durante todo o período de realização dos experimentos.

#### 3.4 Atividade antifúngica do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum truncatum*.

A ação do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o patógeno foi avaliada *in vitro* com a adição do óleo essencial ao meio de cultura, em quatro concentrações (0,05; 0,1; 0,15; 0,2%). Inicialmente, os tratamentos foram solubilizados em Tween 20®, na proporção de 1:1, aferidos nas concentrações testadas e adicionados ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) esterilizado fundente (50 °C). O meio foi, então, vertido em placas de Petri de vidro (9 cm de diâmetro) e, após a solidificação dos mesmos, um disco de meio de cultura (0,5 cm de diâmetro) contendo micélio do fitopatógeno foi repicado para a posição central da placa. O tratamento testemunha

foi constituído de meio BDA sem adição do óleo essencial. As placas foram mantidas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada no décimo quinto dia após a instalação do teste, quando a colônia no tratamento testemunha atingiu a totalidade da placa de Petri, medindo-se o diâmetro da colônia em duas posições perpendiculares, utilizando-se paquímetro digital, e considerando-se a média das duas medições. O percentual de inibição do crescimento (PIC) do patógeno foi calculado utilizando-se a fórmula:

$$PIC = \frac{(\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento})}{(\text{Diâmetro da testemunha})} \times 100$$

O experimento foi realizado em duplicata, em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição. Os dados de crescimento micelial *in vitro* e porcentagem de inibição do crescimento (PIC) não seguiram distribuição normal e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

### 3.5 Obtenção das sementes de soja

As sementes de soja foram obtidas junto à empresa TMG®, sendo uma linhagem irmã da cultivar TMG 2165 IPRO, pertencente ao grupo de maturação 6.5 e produzida no Estado do Tocantins.

#### 3.5.1 Determinação do teor de umidade das sementes

O teor de umidade foi determinado por meio do método padrão de estufa a 105°C ± 3°C. Quatro subamostras de 10g, retiradas da amostra média, foram acondicionadas em recipientes metálicos e levadas à estufa a 105 °C, onde permaneceram por 24 horas, sendo pesadas novamente ao final desse período. O resultado final foi obtido através da média aritmética das porcentagens de cada uma das subamostras e expresso em porcentagem (%) b.u. (base úmida) (Brasil, 2009b). O teor de umidade das sementes foi determinado antes da realização dos tratamentos, sendo este de 14%.

### 3.5.2 Obtenção de sementes de soja infectadas com *Colletotrichum truncatum*

O isolado de *C. truncatum* foi inicialmente cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e, após dez dias de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente, foram retirados discos de 0,5 cm de colônia fúngica e transferidos para placas de Petri contendo BDA. Após o fungo ocupar a totalidade da placa de Petri, sementes de soja previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por um minuto e secas sobre folhas de papel de filtro esterilizado foram depositadas nas placas em camada única, permanecendo em contato com as colônias por 24 horas. Após a inoculação, as sementes foram novamente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 2% e secas em condições ambiente. As sementes não inoculadas foram submetidas ao mesmo processo, porém sem a presença do inóculo no meio de cultura. As sementes inoculadas foram misturadas às sementes sadias de modo a compor um lote de trabalho com 20% de infecção.

### 3.6 Tecnologia de aplicação de óleos essenciais no tratamento de sementes de soja visando o controle de *Colletotrichum truncatum*

Para se determinar a melhor tecnologia de aplicação dos óleos essenciais no tratamento das sementes, foram avaliadas duas técnicas com três períodos de tratamento, sendo: imersão (3, 6 e 9 minutos) e aspersão (1, 2 e 3 minutos). O óleo essencial foi utilizado na concentração de 0,10%, conforme determinação em ensaios preliminares. Sendo assim, para cada tratamento foram utilizados 300 µL de óleo essencial para 300 mL de água destilada esterilizada. Foi utilizado o emulsificante Tween 20®, na proporção de 1:1, com a finalidade de solubilizar o tratamento.

Para a técnica de imersão, as sementes foram colocadas em um Becker com capacidade máxima de 500 mL, imersas em cada tratamento e homogeneizadas por agitação com um bastão de vidro, nos tempos determinados. A técnica de aspersão foi realizada utilizando um borrifador com capacidade de 500 mL. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel toalha e o óleo essencial aplicado via aspersão manual, com 20 cm de distância, durante o tempo determinado para cada tratamento. Foi incluído um tratamento testemunha constituído por sementes não tratadas.

### **3.6.1 Avaliação da qualidade sanitária**

A sanidade das sementes foi avaliada por meio do método do papel filtro, utilizando vinte repetições de 10 sementes, alocadas em placas Petri plásticas (com 9 cm de diâmetro) contendo três folhas de papel de filtro umedecidas em água destilada. Posteriormente, as placas de Petri foram colocadas em câmara de incubação (BOD), com temperatura de 22 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente, durante 8 dias. A avaliação foi realizada utilizando microscópio estereoscópico e, quando necessário, microscópio ótico (Brasil, 2009a). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas pelo patógeno.

### **3.6.2 Avaliação da qualidade fisiológica**

A qualidade fisiológica das sementes tratadas foi avaliada por meio dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, comprimento de plântulas, massa seca de plântulas em laboratório, emergência e índice de velocidade de emergência em casa de vegetação, conforme descrito a seguir.

#### **3.6.2.1 Testes de germinação e primeira contagem de germinação**

O teste de germinação foi conduzido de acordo com Brasil (2009b), com oito repetições de 50 sementes, totalizando 400 sementes por tratamento. As sementes foram dispostas sobre duas folhas de papel germitest e cobertas com uma terceira, previamente umedecidas com água destilada no volume de 2,5 vezes a massa do papel seco. Posteriormente, foram confeccionados rolos e estes foram levados ao germinador, com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente. A avaliação da germinação final foi realizada no oitavo dia após a instalação do teste, contabilizando-se o número de plântulas normais germinadas, sendo o resultado expresso em porcentagem de germinação.

Concomitante ao teste de germinação foi realizado o teste de vigor, contabilizando o número de plântulas normais no quinto dia após a instalação do teste (Brasil, 2009b).

### 3.6.2.2 Comprimento e massa seca de plântulas

O comprimento de plântulas foi determinado de acordo com as recomendações de Krzyzanowski *et al.* (2020), utilizando-se cinco subamostras de 20 sementes dispostas sobre linha traçada no terço superior do papel germitest, umedecido com água destilada no volume de 2,5 vezes a massa do papel seco, no sentido longitudinal. Foram confeccionados rolos, que foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos, verticalmente, no germinador a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente por oito dias. Após este período, foram medidas a parte aérea e radicular, separadamente, utilizando-se régua graduada. Os resultados foram expressos em centímetros.

A massa seca de plântulas foi determinada, utilizando-se as plântulas obtidas ao final do teste de comprimento, sendo realizada a remoção dos resquícios dos cotilédones. As plântulas foram colocadas em sacos de papel, secas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65 °C, durante 48 horas. Após este período, as plântulas foram pesadas utilizando balança de precisão. Os cálculos foram efetuados dividindo-se a massa obtida pelo número de plântulas contidas em cada rolo de papel e os resultados, expressos em mg plântula<sup>-1</sup> (Krzyzanowski *et al.*, 2020).

### 3.6.2.3 Emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas em casa de vegetação

O teste foi realizado em bandejas contendo areia autoclavada, sendo semeadas 50 sementes por bandeja, com quatro repetições por tratamento. A semeadura foi realizada manualmente a uma profundidade de 3 cm e a irrigação foi realizada diariamente. A contagem de plântulas emergidas foi feita no décimo quarto dia após a semeadura, considerando como plântulas normais as que possuíam cotilédone totalmente expandido, epicótilo e plúmula evidente, e os resultados foram expressos em porcentagem (Brasil, 2009b).

O teste de índice de velocidade de emergência foi conduzido juntamente com o de emergência de plântulas, avaliando-se diariamente o número de plântulas normais emergidas até o 14º dia, quando houve a estabilização do processo. Foram consideradas emergidas as plântulas com cotilédones totalmente fora do substrato, com angulação paralela à superfície do substrato e com o tegumento solto. O resultado de IVE foi obtido utilizando a fórmula de Maguire (1962):

$$IVE = E1/N1 + E2/N2 + \dots En/Nn$$

Em que:

E1, E2, ... En = número de plântulas normais emergidas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem.

N1, N2, ... Nn = número de dias da semeadura à primeira, segunda e última contagem.

### 3.6.3 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado em duplicata, em delineamento inteiramente casualizado. Resultados em porcentagem foram transformados para  $\arcsin \sqrt{(x/100)}$ , para a realização da análise estatística. Os dados apresentaram distribuição normal e foram submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 3.7 Avaliação da integração de tratamentos alternativos de sementes de soja para o controle de *Colletotrichum truncatum*

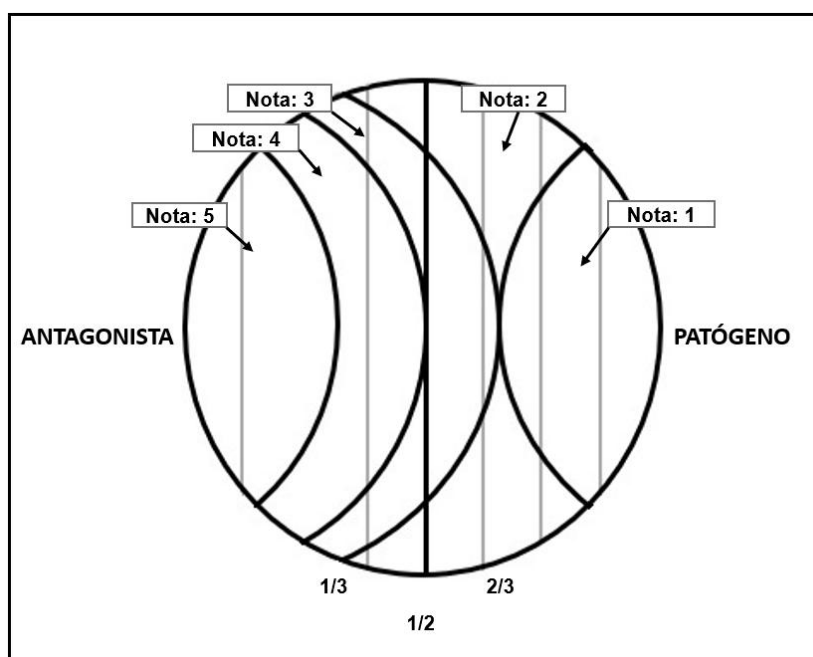
### 3.7.1 Avaliação do antagonismo de *Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea* sobre *Colletotrichum truncatum*

Os antagonistas *T. harzianum* e *C. rosea* empregados neste trabalho foram obtidos junto a Embrapa Meio Ambiente. O efeito antagonista destes sobre *C. truncatum* foi avaliado *in vitro*, por meio do método de confronto direto proposto por Dennis e Webster (1971). Os fungos foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e, após o décimo quarto dia de cultivo, foram retirados discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro para a realização do teste. Foram realizados o pareamento dos antagonistas com o patógeno em três períodos: 1) simultâneo, 2) pré-estabelecimento de *C. truncatum* 48 horas e, 3) pré-estabelecimento de *C. truncatum* 72 horas antes do antagonista. Cada pareamento (patógeno x antagonista) foi realizado em placa de Petri contendo meio de cultura BDA solidificado, dispondo, em sentidos opostos, um disco de micélio de cada agente a uma distância de 1,0 cm da borda da placa. O tratamento testemunha consistiu em placas de BDA contendo um disco do patógeno. As placas foram mantidas em BOD

a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente, durante quinze dias.

A avaliação foi realizada no décimo quinto dia, quando o crescimento do patógeno da testemunha atingiu a totalidade da placa de Petri. Os isolados foram avaliados com atribuição de notas, de acordo com o critério proposto por Bell, Wells e Markham (1982).

**Figura 1 – Representação escala de notas proposta por Bell, Wells e Markham (1982)**



**Fonte:** Bell, Wells e Markham (1982)

NOTA 1- Sobreposição de *Trichoderma harzianum*/*Clonostachys rosea*, que colonizou toda a superfície do meio e diminuiu a colônia de *Colletotrichum truncatum*.

NOTA 2- Sobreposição de *Trichoderma harzianum*/*Clonostachys rosea*, que colonizou pelo menos  $2/3$  da superfície do meio.

NOTA 3- *Trichoderma harzianum*/*Clonostachys rosea* e *Colletotrichum truncatum* colonizaram mais que  $1/3$  e menos que  $2/3$  da superfície do meio.

NOTA 4- *Colletotrichum truncatum* colonizou ao menos  $2/3$  da superfície do meio, sem sobreposição de *Trichoderma harzianum*/*Clonostachys rosea*.

NOTA 5- Sobreposição de *Colletotrichum truncatum* que colonizou toda a superfície do meio.

Foi realizado um experimento para cada antagonista (*Colletotrichum truncatum* x *Trichoderma harzianum* e *Colletotrichum truncatum* x *Clonostachys rosea*), ambos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição. Os dados não seguiram distribuição normal e as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

### 3.7.2 Tratamento de sementes

Para avaliar a viabilidade do tratamento de sementes com óleo essencial integrado a outros agentes de controle, foram empregados os seguintes tratamentos: 1) Testemunha (não tratada); 2) OE de cravo-da-índia; 3) OE de cravo-da-índia + *Trichoderma harzianum*; 4) OE de cravo-da-índia + *Clonostachys rosea*; 5) *Trichoderma harzianum*; 6) *Clonostachys rosea*, 7) Fungicida Standak® Top (Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil).

Para o tratamento de sementes com óleos essenciais, foi empregada a técnica de aspersão por 1 minuto, que apresentou melhor desempenho no experimento anterior, utilizando o procedimento descrito no item 3.6. Para o tratamento químico, o fungicida Standak® Top foi empregado na concentração de 200 mL p.c./100kg de sementes, conforme recomendações para a cultura. Para o tratamento biológico, as concentrações de esporos de *T. harzianum* e *C. rosea* foram ajustadas para  $1 \times 10^6$  UFC/mL com o auxílio de um hemocítômetro. As quantidades de produtos foram ajustadas para o peso de 300 g de sementes por tratamento. Os produtos (químico e biológicos) foram aplicados nas sementes nas concentrações pré-estabelecidas e com volume de calda de 500 mL/100 kg de sementes, em sacos plásticos, com agitação vigorosa por três minutos. Nos tratamentos que consistiam na associação dos antagonistas com o óleo essencial, cada um dos mesmos foi aplicado isoladamente, sendo realizado primeiro o tratamento com os óleos essenciais, seguido do tratamento biológico. Após a realização dos tratamentos, as sementes permaneceram em temperatura ambiente de laboratório a fim de promover a secagem dos produtos. Sementes não tratadas

foram submetidas ao mesmo procedimento, empregando-se água destilada esterilizada.

### **3.7.3 Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes**

A qualidade fisiológica foi avaliada por meio dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, comprimento e massa seca de plântulas, e a sanidade foi avaliada por meio do método de papel de filtro, conforme descrito anteriormente.

### **3.7.4 Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Foi verificada a normalidade dos dados. Para os testes de avaliação da qualidade fisiológica, as medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Para a qualidade sanitária, as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Atividade antifúngica do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o crescimento micelial e percentual de inibição de crescimento do *Colletotrichum truncatum*

Todas as concentrações do óleo essencial (OE) reduziram o crescimento do patógeno com porcentagem de inibição de crescimento variando entre 99,42% (concentração 0,05%) a 100% (demais concentrações) (Tabela 2).

**Tabela 2 – Crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento (PIC) do fungo *Colletotrichum truncatum* cultivado em meio de cultura BDA acrescido de óleo essencial de cravo-da-índia em diferentes concentrações.**

| Concentração do óleo essencial (%) | Crescimento micelial (cm) | PIC (%)             |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| 0,00 (testemunha)                  | 8,40 a                    | -                   |
| 0,05                               | 0,05 b                    | 99,42 a             |
| 0,10                               | 0,00 b                    | 100,00 a            |
| 0,15                               | 0,00 b                    | 100,00 a            |
| 0,20                               | 0,00 b                    | 100,00 a            |
| p-valor                            | 0,003*                    | 0,094 <sup>ns</sup> |

\*- significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup>- não significativo. Medianas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P > 0,05$ ).

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a ação fungitóxica do óleo essencial de cravo-da-índia, cuja eficiência no controle de diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* já foi relatada em ensaios *in vitro*. O crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, isolado de cafeeiro, foi completamente inibido pelo óleo essencial de cravo-da-índia, nas concentrações de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0% (Pierre, 2009). Para um isolado de pimentão, desta mesma espécie fúngica, também houve 100% de inibição do crescimento micelial pelos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela, eucalipto, hortelã e manjeriço (Nascimento, 2017). Da mesma maneira, este óleo essencial, a partir da concentração de 2%, inibiu totalmente o crescimento micelial de *C. musae*, sendo o efeito inibitório, sobre o patógeno, proporcional ao aumento das concentrações (Araújo, Toledo e Soares, 2018). Para *C. orbiculare*, o desenvolvimento fúngico foi 100% inibido pelo óleo essencial de cravo-da-índia nas concentrações de 200  $\mu\text{L L}^{-1}$  24 horas após a repicagem do patógeno, e de 400 e

800  $\mu\text{L L}^{-1}$ , 48 e 72 horas após a repicagem, demonstrando o potencial fungitóxico do óleo (Guerra, Barbosa e Vieira, 2021).

Resultados semelhantes da ação antifúngica *in vitro* do óleo essencial de cravo-da-índia foram relatados sobre outras espécies patogênicas. Este óleo essencial promoveu uma redução do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer*, na concentração de 200 mg  $\text{mL}^{-1}$  (Silva, 2008). O desenvolvimento de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* foi totalmente inibido pelo óleo essencial de cravo-da-índia na concentração de 0,15% (Costa *et al.*, 2011). A porcentagem de inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides*, *Macrophomina phaseolina* e *M. pseudophaseolina* pelo óleo essencial de cravo-da-índia aumentou gradativamente conforme o aumento da concentração do óleo, com inibição total de *Fusarium verticillioides* a partir da concentração de 0,05% e das espécies de *Macrophomina phaseolina* e *M. pseudophaseolina* a partir de 0,1%, sendo estas as concentrações mínimas inibitórias para cada fitopatógeno (Lima, 2019).

Óleos essenciais de várias espécies vegetais têm ação antimicrobiana sobre diversos agentes fitopatogênicos. O óleo essencial de cravo-da-índia se destaca pela intensa atividade fungitóxica, que é atribuída, principalmente, ao eugenol, seu composto majoritário (Barros *et al.*, 2024). O eugenol atua diretamente sobre os fitopatógenos, comprometendo a parede celular e a membrana plasmática (Ju *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2023). Essa interferência provavelmente se dá pela inibição da síntese do ergosterol (Achimón *et al.*, 2021; Jesus, 2023), componente essencial da membrana celular fúngica (Fukuyama *et al.*, 2025). O óleo essencial utilizado neste estudo era composto por mais de 88% de eugenol. Portanto, é provável que a ação fungitóxica observada no presente trabalho e nos outros anteriormente mencionados, com inibição total ou acentuada do crescimento fúngico, se deva a essa propriedade do eugenol. Esses resultados evidenciam o potencial do óleo essencial de cravo-da-índia no controle de fitopatógenos, o que o credencia como alternativa promissora e eficiente aos fungicidas sintéticos no manejo de doenças em plantas.

## 4.2 Qualidade sanitária de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum* e tratadas com óleo essencial de cravo-da-índia

No ensaio 1, a técnica de aspersão por 3 minutos resultou em menor incidência do patógeno, quando comparado à testemunha e à técnica de imersão por 9 minutos, não diferindo das demais (Tabela 3). Já no ensaio 2, as técnicas de imersão por 6 e 9 minutos diferiram da testemunha, apresentando menor incidência do patógeno; ambas as técnicas não diferiram dos demais tratamentos.

**Tabela 3 – Incidência de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja tratadas com óleo essencial (OE) de cravo-da-índia utilizando as técnicas de imersão e aspersão.**

| TRATAMENTOS         | Ensaio 1                          |                | Ensaio 2                          |                |
|---------------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|
|                     | Incidência de <i>C. truncatum</i> |                | Incidência de <i>C. truncatum</i> |                |
|                     | arc sen√(x/100) <sup>1</sup>      | % <sup>2</sup> | arc sen√(x/100) <sup>1</sup>      | % <sup>2</sup> |
| Testemunha          | 23,34 a                           | 20,00          | 17,40 a                           | 12,50          |
| Imersão em OE 3 min | 17,02 abc                         | 12,50          | 11,49 ab                          | 9,50           |
| Imersão em OE 6 min | 15,06 abc                         | 10,50          | 6,34 b                            | 4,00           |
| Imersão em OE 9 min | 20,70 ab                          | 16,00          | 4,09 b                            | 2,50           |
| Aspersão OE 1 min   | 14,53 abc                         | 9,00           | 11,77 ab                          | 7,50           |
| Aspersão OE 2 min   | 11,47 bc                          | 6,50           | 8,93 ab                           | 6,00           |
| Aspersão OE 3 min   | 7,37 c                            | 4,00           | 9,62 ab                           | 5,50           |
| F                   | 4,16**                            |                | 2,74*                             |                |
| C.V. (%)            | 75,50                             |                | 116,19                            |                |
| dms (5%)            | 11,18                             |                | 10,94                             |                |

<sup>1</sup>-Dados transformados; <sup>2</sup>-Dados originais; \*\*- significativo a 1%; \*- significativo a 5%. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Embora os trabalhos sobre controle de fitopatógenos com óleos essenciais se concentrem predominantemente nos efeitos *in vitro*, o emprego desses compostos *in vivo*, incluindo o tratamento de sementes, vem sendo investigado.

O tratamento de sementes de feijão com óleo essencial de cravo-da-índia na concentração de 80 µL L<sup>-1</sup> foi eficaz no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, com inibição total do seu desenvolvimento (Neves e Vieira, 2017). Para sementes de soja, o tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia, na dose de 1,6 mL L<sup>-1</sup>, reduziu significativamente a incidência de patógenos (Costa, 2023).

O tratamento de sementes de sorgo por imersão durante 15 minutos em solução de óleo essencial de alfavaca cravo nas concentrações 0, 5, 10 e 15 µL/mL, foi eficiente no controle de fitopatógenos presentes nas sementes, mas, para *Curvularia* spp., o principal fitopatógeno detectado, só houve redução significativa da

incidência na maior concentração. No entanto, esta concentração prejudicou a germinação e o vigor das sementes, indicando um possível efeito fitotóxico (Flávio *et al.*, 2014). Moraes *et al.* (2008) realizaram o tratamento de sementes de feijão por imersão a 1 minuto em soluções com óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* e *C. flexuosus*), manjerição e melaleuca, em um lote com incidência de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp. e em outro lote, sem patógenos. Os autores verificaram que os dois óleos de capim-limão e o de melaleuca controlaram *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., mas nenhum tratamento foi capaz de reduzir significativamente a incidência de *Cladosporium*. Além disso, o óleo de *C. citratus* prejudicou a germinação das sementes no lote sem patógenos, enquanto os óleos de *C. flexuosus* e de melaleuca reduziram a germinação no lote de sementes infestadas.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada às substâncias presentes em sua composição, incluindo monoterpenos, terpenóides e compostos fenólicos. Diversos fatores interferem na qualidade dos óleos essenciais, cuja composição pode variar com as condições climáticas, tipo, idade e parte da espécie vegetal, horário de coleta e preparação da matéria prima, entre outros (Maia, Donato e Fraga, 2015). Desta forma, a atividade biológica dos óleos essenciais pode variar. Além disso, há que se considerar as características dos próprios microrganismos alvos, possíveis interações e a técnica de aplicação dos óleos essenciais para que seu emprego no controle de fitopatógenos seja bem sucedido.

O potencial fungitóxico do óleo essencial de cravo-da-índia sobre *C. truncatum*, atestado nos ensaios *in vitro*, e a redução da incidência deste fungo nas sementes tratadas com este óleo essencial, evidenciam a viabilidade do emprego deste composto no controle deste patógeno em sementes de milho.

É notável a expansão das pesquisas relacionadas ao uso de óleos essenciais para o controle de fitopatógenos. Entretanto, dependendo da concentração do óleo essencial utilizado e sua composição, este pode afetar o desenvolvimento das plântulas, apresentando efeito fitotóxico (Moura *et al.*, 2017). Isso se dá devido à composição complexa e concentrada dos óleos essenciais, que contribuem para justificar seu efeito satisfatório mesmo em baixas concentrações (Mesquita *et al.*, 2017). Por este motivo, é necessário definir a maneira mais adequada de se

empregar o óleo essencial para que os resultados de controle sejam satisfatórios sem haver prejuízo ao potencial fisiológico das sementes.

#### 4.3 Qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com óleo essencial de cravo-da-índia por meio das técnicas de imersão e aspersão

Para a variável vigor (primeira contagem de germinação), no ensaio 1 não houve diferença significativa entre a testemunha e demais tratamentos. Entretanto, no ensaio 2, a testemunha apresentou a menor média de vigor, diferindo dos demais tratamentos, com exceção ao tratamento de imersão por 6 minutos (Tabela 4). A germinação das sementes não diferiu significativamente entre os tratamentos em ambos os ensaios.

**Tabela 4 – Vigor (Primeira contagem de germinação - PCG) e germinação de sementes de soja tratadas com óleo essencial (OE) de cravo-da-índia utilizando as técnicas de imersão e aspersão.**

| Ensaio 1            |                                  |          |                                  |          |
|---------------------|----------------------------------|----------|----------------------------------|----------|
| TRATAMENTOS         | PCG                              |          | Germinação                       |          |
|                     | $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}^1$ | $(\%)^2$ | $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}^1$ | $(\%)^2$ |
| Testemunha          | 69,32 a                          | 86,50    | 74,01 a                          | 90,75    |
| Imersão em OE 3 min | 65,29 a                          | 82,25    | 71,05 a                          | 89,25    |
| Imersão em OE 6 min | 66,66 a                          | 83,25    | 72,50 a                          | 89,50    |
| Imersão em OE 9 min | 71,31 a                          | 89,50    | 74,92 a                          | 92,75    |
| Aspersão OE 1 min   | 71,06 a                          | 89,00    | 76,11 a                          | 93,25    |
| Aspersão OE 2 min   | 72,31 a                          | 90,50    | 76,38 a                          | 94,25    |
| Aspersão OE 3 min   | 71,48 a                          | 89,75    | 73,25 a                          | 91,50    |
| F                   | 2,35*                            |          | 0,94 <sup>NS</sup>               |          |
| C.V. (%)            | 7,11                             |          | 7,62                             |          |
| dms (5%)            | 7,61                             |          | 8,67                             |          |

| Ensaio 2            |                                  |          |                                  |          |
|---------------------|----------------------------------|----------|----------------------------------|----------|
| TRATAMENTOS         | PCG                              |          | Germinação                       |          |
|                     | $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}^1$ | $(\%)^2$ | $\text{arc sen}\sqrt{(x/100)}^1$ | $(\%)^2$ |
| Testemunha          | 53,22 c                          | 64,00    | 65,98 a                          | 83,25    |
| Imersão em OE 3 min | 62,20 ab                         | 78,00    | 70,96 a                          | 87,75    |
| Imersão em OE 6 min | 58,91 bc                         | 73,00    | 67,82 a                          | 85,00    |
| Imersão em OE 9 min | 65,39 ab                         | 82,50    | 68,91 a                          | 86,75    |
| Aspersão OE 1 min   | 68,21 a                          | 85,75    | 71,71 a                          | 89,50    |
| Aspersão OE 2 min   | 62,03 ab                         | 77,75    | 73,04 a                          | 91,25    |
| Aspersão OE 3 min   | 62,11 ab                         | 77,75    | 71,78 a                          | 89,50    |
| F                   | 9,15**                           |          | 1,67 <sup>NS</sup>               |          |
| C.V. (%)            | 7,21                             |          | 7,90                             |          |
| dms (5%)            | 6,85                             |          | 8,50                             |          |

<sup>1</sup>-Dados transformados; <sup>2</sup>-Dados originais; \*\*- significativo a 1%; \*- significativo a 5%; <sup>NS</sup>- não significativo. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em ambos os ensaios, a porcentagem de germinação se manteve acima de 80%, o que atende às exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a comercialização de sementes dessa espécie (Brasil, 2013). O fato de não haver diferença significativa na germinação das sementes tratadas e a testemunha não tratada demonstra que o óleo essencial não afetou a germinação. Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com aqueles obtidos por Santos (2018), que observou que o tratamento de sementes de feijão com óleo essencial de cravo-da-índia na dose de 0,25% não interferiu no vigor nem na germinação das sementes. No entanto, o autor constatou que concentrações mais elevadas (0,50% e 0,75%) afetaram negativamente essas variáveis.

Para ser uma alternativa viável no controle de patógenos, o tratamento com óleos essenciais não pode prejudicar a germinação destas. Hillen *et al.* (2012) testaram os óleos essenciais de candeia, alecrim e palmarosa no tratamento de sementes de soja, feijão e milho, por meio de fumigação, e verificaram efeito alelopático diferenciado dos óleos na germinação das sementes. Nesse estudo, o óleo essencial de alecrim resultou nos menores percentuais de germinação de feijão e milho, enquanto o de palmarosa inibiu totalmente a germinação de sementes de soja, indicando que, nas condições testadas, esses óleos essenciais não seriam boas opções para o tratamento de sementes das respectivas culturas.

Lima e Villela (2017) testaram duas formas de aplicação dos óleos essenciais de alho e laranja no tratamento de sementes de três cultivares de manjerição: imersão direta das sementes na solução por 1 minuto e pulverização da solução em papel filtro fixado na tampa do recipiente contendo as sementes, sem haver o contato direto destas com os produtos. Os tratamentos foram realizados com as concentrações dos dois óleos variando em 1% de 1 a 10% e não provocaram efeitos negativos na germinação das sementes. Os autores ressaltaram que, para algumas concentrações, a técnica de imersão resultou em germinação ligeiramente inferior ao da técnica indireta, mas consideraram que esta última seria inviável na prática para os agricultores. Estudo prévio havia demonstrado que o extrato de alho e o óleo essencial de laranja a 10% controlam *A. alternata* (Lima *et al.*, 2016), portanto, esses produtos poderiam ser aplicados no tratamento de manjerição para o controle de *Alternaria*, sem prejuízos ao poder germinativo das sementes.

O tratamento de sementes de feijão-fava com óleos essenciais de copaíba, cravo-da-índia e manjerição, a 1,0; 1,5 e 2,0 mL. L<sup>-1</sup>, por meio da técnica de imersão por 3 minutos, não influenciou no vigor e germinação das mesmas. No entanto, o tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia a 2 mL L<sup>-1</sup> reduziu significativamente a emergência inicial, no índice de velocidade de emergência e no desenvolvimento das plântulas comprometendo a qualidade fisiológica das sementes (Gomes *et al.*, 2016).

Óleos essenciais que contêm eugenol como seu composto majoritário podem apresentar toxicidade quando utilizados em altas concentrações. Esse composto se liga fortemente ao tanino por meio de pontes de hidrogênio, o que pode inibir a germinação das sementes (Oliveira *et al.*, 2011). Por esse motivo, torna-se essencial determinar uma dose segura para a utilização do óleo essencial, de forma a garantir sua eficácia sem comprometer a qualidade fisiológica das sementes.

Para as variáveis comprimento de parte aérea e massa seca de plântulas, em ambos os ensaios, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5). Em relação ao comprimento de raiz, no ensaio 1, a testemunha diferiu dos tratamentos por imersão 9 minutos e aspersão 2 e 3 minutos, apresentando resultado superior a estes. Já no ensaio 2, para a mesma variável, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

O tratamento de sementes crioulas de milho com óleos essenciais de alecrim e cravo resultou em incremento no comprimento e na massa seca de plântulas, enquanto os óleos essenciais de citronela, limão, olíbano e lavanda provocaram efeito negativo sobre essas variáveis (Dias *et al.*, 2021). Já o tratamento de sementes de feijão-fava com óleo essencial de cravo-da-índia (concentração de 2 mL. L<sup>-1</sup>) e de manjerição (1 mL. L<sup>-1</sup>) resultou na redução do comprimento de plântulas e interferiu negativamente no vigor das sementes. Entretanto, em concentrações menores (1 mL. L<sup>-1</sup> e 1,5 mL. L<sup>-1</sup>), o óleo essencial de cravo-da-índia não influenciou no comprimento de plântulas (Gomes *et al.*, 2016).

**Tabela 5 – Comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR) e peso de massa seca (PMS) de sementes de soja tratadas com óleo essencial (OE) de cravo-da-índia utilizando as técnicas de imersão e aspersão.**

| TRATAMENTOS         | Ensaio 1           |                    |                      |
|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
|                     | CPA<br>(cm)        | CR<br>(cm)         | PMS<br>(mg/plântula) |
| Testemunha          | 14,16 a            | 17,67 a            | 123,53 a             |
| Imersão em OE 3 min | 13,11 a            | 16,90 ab           | 124,09 a             |
| Imersão em OE 6 min | 12,15 a            | 16,38 ab           | 117,91 a             |
| Imersão em OE 9 min | 11,94 a            | 15,67 b            | 127,81 a             |
| Aspersão OE 1 min   | 13,36 a            | 16,47 ab           | 120,96 a             |
| Aspersão OE 2 min   | 12,77 a            | 15,52 b            | 118,16 a             |
| Aspersão OE 3 min   | 12,98 a            | 15,63 b            | 119,84 a             |
| Teste F             | 1,61 <sup>NS</sup> | 4,91 <sup>**</sup> | 1,23 <sup>NS</sup>   |
| C.V.%               | 10,16              | 4,86               | 5,93                 |
| DMS (5%)            | 2,64               | 1,59               | 14,50                |

| TRATAMENTOS         | Ensaio 2           |                    |                      |
|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
|                     | CPA<br>(cm)        | CR<br>(cm)         | PMS<br>(mg/plântula) |
| Testemunha          | 11,09 a            | 17,40 a            | 118,24 a             |
| Imersão em OE 3 min | 13,50 a            | 17,86 a            | 115,08 a             |
| Imersão em OE 6 min | 13,91 a            | 17,67 a            | 120,70 a             |
| Imersão em OE 9 min | 13,05 a            | 16,93 a            | 117,59 a             |
| Aspersão OE 1 min   | 12,06 a            | 17,12 a            | 117,29 a             |
| Aspersão OE 2 min   | 11,95 a            | 17,28 a            | 119,24 a             |
| Aspersão OE 3 min   | 12,23 a            | 17,14 a            | 9,55 a               |
| Teste F             | 2,29 <sup>NS</sup> | 0,94 <sup>NS</sup> | 0,38 <sup>NS</sup>   |
| C.V.%               | 11,68              | 4,36               | 5,63                 |
| DMS (5%)            | 2,94               | 1,52               | 13,36                |

<sup>\*\*</sup>- significativo a 1%; <sup>NS</sup> - não significativo. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Para as variáveis índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência em casa de vegetação, não houve diferença significativa entre os tratamentos em ambos os ensaios, com exceção do IVE, no ensaio 2, onde o tratamento aspersão por 1 minuto diferiu dos tratamentos de imersão por 6 minutos e da testemunha, resultando em médias superiores aos mesmos (Tabela 6).

O índice de velocidade de emergência auxilia na estimativa do vigor das sementes ao demonstrar que quanto mais rápida for a emergência de plântulas, maior o vigor das sementes. Dessa forma, as plântulas emergidas passam pelos estádios iniciais de desenvolvimento mais rápido, permanecendo expostas a condições adversas por um período menor (Luiz *et al.*, 2017).

**Tabela 6 – Índice de velocidade de emergência (IVE) e emergência de plântulas provenientes de sementes de soja tratadas com óleo essencial (OE) de cravo-da-índia utilizando as técnicas de imersão e aspersão, em casa de vegetação.**

| TRATAMENTOS         | Ensaio 1            |                     | Ensaio 2 |                     |
|---------------------|---------------------|---------------------|----------|---------------------|
|                     | IVE                 | Emergência (%)      | IVE      | Emergência (%)      |
| Testemunha          | 6,87 a              | 87,5 a              | 7,47 b   | 89,0 a              |
| Imersão em OE 3 min | 8,21 a              | 92,0 a              | 8,58 ab  | 93,5 a              |
| Imersão em OE 6 min | 7,09 a              | 90,5 a              | 7,43 b   | 86,0 a              |
| Imersão em OE 9 min | 7,63 a              | 90,5 a              | 7,97 ab  | 88,5 a              |
| Aspersão OE 1 min   | 8,76 a              | 94,5 a              | 8,67 a   | 94,5 a              |
| Aspersão OE 2 min   | 8,52 a              | 93,0 a              | 7,96 ab  | 90,0 a              |
| Aspersão OE 3 min   | 8,03 a              | 93,0 a              | 8,44 ab  | 89,5 a              |
| Teste F             | 0,472 <sup>NS</sup> | 0,754 <sup>NS</sup> | 0,0067** | 0,270 <sup>NS</sup> |
| C.V. (%)            | 18,30               | 6,69                | 6,18     | 5,56                |
| DMS (5%)            | 3,31                | 14,08               | 1,14     | 11,52               |

\*\* - Significativo a 1% de probabilidade; <sup>NS</sup> - Não significativo. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

Sementes de arroz tratadas com extratos vegetais de cravo-da-índia, alho e gengibre apresentaram porcentagens de emergência de plântulas em solo superiores à testemunha e semelhantes ao tratamento com fungicida. Além disso, os mesmos extratos proporcionaram maiores índices de velocidade de emergência (Silva *et al.*, 2019).

O tratamento de sementes é uma etapa importante que ajuda a preservar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes, fazendo-se necessária a busca por moléculas que agreguem neste processo. Os óleos essenciais mostram-se como uma alternativa promissora e eficiente no controle de fitopatógenos, entretanto, devida sua ampla gama de compostos, há dúvidas quanto a sua formulação, dosagem e método de aplicação.

Ao utilizar o método de aplicação por imersão, onde as sementes ficaram em contato direto com o produto por um período maior, foram observados alguns danos e rachaduras no tegumento da mesma, fato este que pode interferir negativamente em sua qualidade fisiológica e favorecer a entrada de patógenos. Por este motivo, e diante dos resultados obtidos, adotou-se a técnica de aspersão por 1 minuto para a realização do experimento seguinte.

#### 4.4 Antagonismo de *Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea* sobre o fitopatógeno *Colletotrichum truncatum*

Os antagonistas *T. harzianum* e *C. rosea* inibiram o desenvolvimento de *C. truncatum* em todos os tratamentos (Tabela 7), evidenciando, assim, potencial para o controle deste patógeno.

Os resultados corroboram os obtidos por Lohmann *et al.* (2022), que observaram que várias espécies *Trichoderma* reduziram o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, constatando que o isolado de *T. harzianum* proporcionou melhores resultados de controle em relação às demais espécies antagonistas.

**Tabela 7 – Crescimento *in vitro* do fitopatógeno *Colletotrichum truncatum* na presença dos antagonistas *Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea***

| Tratamentos                                            | Medianas <sup>1</sup> |
|--------------------------------------------------------|-----------------------|
| <i>C. truncatum</i>                                    | 5,00 a                |
| <i>C. truncatum</i> x <i>T. harzianum</i> (simultâneo) | 1,00 b                |
| <i>C. truncatum</i> x <i>T. harzianum</i> (48 horas)   | 2,00 b                |
| <i>C. truncatum</i> x <i>T. harzianum</i> (72 horas)   | 1,50 b                |
| p-valor                                                | 0,02*                 |
| Tratamentos                                            | Medianas <sup>1</sup> |
| <i>C. truncatum</i>                                    | 5,00 a                |
| <i>C. truncatum</i> x <i>C. rosea</i> (simultâneo)     | 3,00 b                |
| <i>C. truncatum</i> x <i>C. rosea</i> (48 horas)       | 3,00 b                |
| <i>C. truncatum</i> x <i>C. rosea</i> (72 horas)       | 4,00 b                |
| p-valor                                                | 0,007*                |

\*- significativo a 5% de probabilidade; <sup>1</sup>- Medianas atribuídas pela escala de Bell. Para cada antagonista, medianas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (P>0,05).

Os resultados do presente trabalho se assemelham aos observados em testes de pareamento de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. para o controle *in vitro* de *Colletotrichum truncatum*, em que o antagonista se sobrepôs à colônia do patógeno, ocupando toda a superfície da placa e inibindo seu crescimento (Farias, Cruz e Duarte, 2020). Da mesma forma, a avaliação de 60 linhagens do gênero *Trichoderma* revelou que todas apresentaram potencial efeito antagônico contra o fitopatógeno *Colletotrichum musae*, com alguns isolados demonstrando maior eficiência do que outros (Barbosa *et al.*, 2021).

Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam diferentes mecanismos de ação, como antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência. Por este motivo, são capazes de competir por espaço e nutrientes, podendo-se, assim, explicar a rapidez de seu crescimento micelial em relação ao fitopatógeno. Dessa forma, devido a um tipo de estímulo próprio nessa disputa, *Trichoderma* spp. leva vantagem sobre o patógeno, reduzindo seu crescimento e, conseqüentemente, apresentando efeito antagônico sobre o mesmo, sendo esta uma característica desejável para o controle alternativo de doenças de plantas (Quevedo *et al.*, 2022).

Diferentes mecanismos de ação antagônica de *Clonostachys rosea* sobre fungos fitopatogênicos foram relatados, sendo os principais o hiperparasitismo, a indução de resistência e a competição, o que o torna um agente de controle ideal (Saraiva *et al.*, 2014). Por possuir um estilo de vida generalista, *C. rosea* apresenta facilidade na competição por recursos e espaço, colonizando o meio antes do patógeno. Um exemplo é a capacidade de *C. rosea* de controlar doenças causadas por *Botrytis cinerea* em diversas culturas, como morangueiro, framboesa e tomateiro. Neste caso, por meio da competição por nutrientes, o antagonista se estabelece na planta e inibe a germinação e o crescimento do fitopatógeno (Sutton *et al.*, 1997).

Em estudos de prospecção, foram obtidos quatro isolados de *Clonostachys rosea*, os quais se mostraram eficientes no controle de *Botrytis cinerea* em folhas de eucalipto e roseira (Nobre *et al.*, 2005). *Clonostachys rosea* controlou *Sclerotinia sclerotiorum* em teste de confronto direto, por meio de parasitismo e produção de metabólitos secundários, e, sob condições controladas, também foi eficiente no controle de *S. sclerotiorum* em plantas de alface e soja (Rodríguez *et al.*, 2011).

Em ensaios *in vitro*, foi observada a ação parasitária de *Clonostachys rosea* sobre fungos do complexo de podridão radicular da ervilha, como *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum*. Dessa forma, fica evidente que *C. rosea* atua sobre diferentes fitopatógenos por meio da interação de distintos mecanismos de ação, sendo essa interação responsável por sua eficiência como agente de biocontrole (Xue, 2003).

#### **4.5 Integração de tratamentos alternativos em sementes de soja**

No teste de sanidade das sementes, observou-se que todos os tratamentos diferiram da testemunha quanto à incidência do fitopatógeno *C. truncatum*, exceto o tratamento com óleo essencial de cravo-da-índia, que não apresentou diferença

significativa em relação à testemunha, assim como também não diferiu dos demais tratamentos (Tabela 8). Em relação a *T. harzianum*, o tratamento com OE + *T. harzianum* apresentou maior incidência do antagonista, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 8). Quanto à incidência de *C. rosea*, o tratamento que apresentou maior incidência deste antagonista foi o de óleo essencial de cravo-da-índia, que não diferiu da testemunha e apresentou diferença significativa para os demais tratamentos (Tabela 8).

**Tabela 8 – Incidência de *Colletotrichum truncatum*, *Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea* em sementes de soja submetidas ao tratamento com óleo essencial (OE) de cravo-da-índia, antagonistas e fungicida.**

| TRATAMENTOS                       | <i>Colletotrichum truncatum</i> (%) | <i>Trichoderma harzianum</i> (%) | <i>Clonostachys rosea</i> (%) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Testemunha                        | 6,5 a                               | 0,5 e                            | 12,5 a                        |
| OE cravo-da-índia                 | 3,0 ab                              | 0,0 e                            | 11,0 a                        |
| OE + <i>Trichoderma harzianum</i> | 0,5 b                               | 94,5 a                           | 0,0 c                         |
| OE + <i>Clonostachys rosea</i>    | 0,5 b                               | 10,0 c                           | 3,5 b                         |
| <i>Trichoderma harzianum</i>      | 0,0 b                               | 76,0 b                           | 0,0 c                         |
| <i>Clonostachys rosea</i>         | 0,0 b                               | 6,5 d                            | 4,0 bc                        |
| Standak® Top                      | 0,0 b                               | 0,0 e                            | 0,0 c                         |
| p-valor                           | 0,0001*                             | 0,0001*                          | 0,0001*                       |

\*- Significativo a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P > 0,05$ ).

Na literatura, é possível encontrar diferentes resultados em relação à eficiência dos óleos essenciais no tratamento de sementes para o controle de patógenos em culturas distintas. O óleo essencial de cravo foi eficiente no controle de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Cladosporium* sp. em sementes de leucena (Olinto *et al.*, 2021). Da mesma forma, esse óleo também apresentou eficiência no controle de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. em sementes de bracinga (*Mimosa scabrella*), enquanto o óleo essencial de eucalipto-limão não apresentou resultados satisfatórios (Stanck *et al.*, 2023). No tratamento de sementes de trigo, o óleo essencial de capim-limão reduziu a incidência de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Alternaria* e *Penicillium*, além da espécie *Dreschelera tritici* (Ticiane, 2013). Já o óleo essencial de gengibre apresentou 75% de eficiência no controle de *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. e *Fusarium* spp. em sementes de soja (Gonçalves, Matos e Moraes, 2009).

Espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Clonostachys* são amplamente empregadas em pesquisas, tanto em condições controladas quanto a campo, como estratégias de controle mais sustentáveis para diversos patógenos causadores de doenças de plantas (Santos *et al.*, 2014). *Clonostachys rosea* reduziu a viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e feijão, sendo considerado um antagonista que apresenta potencial para o biocontrole de doenças (Borel, 2014).

Com a utilização do produto Trichodermil SC<sup>®</sup>, à base de *Trichoderma harzianum*, foi observada uma redução de 33% na contaminação de sementes de soja por *Colletotrichum truncatum*, enquanto o tratamento com óleo essencial de capim-camelô (*Cymbopogon schoenanthus*) resultou em uma redução de 24% na incidência do patógeno. De forma semelhante, para *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, o tratamento com Trichodermil SC<sup>®</sup> também se destacou, apresentando a menor incidência do patógeno (52%), quando comparado aos 68,5% observados tanto na testemunha quanto no tratamento com óleo essencial (Colli, 2022).

No tratamento de sementes de duas cultivares de feijão com diferentes espécies de *Trichoderma*, foi observado que o controle de *Colletotrichum lindemuthianum* foi semelhante ao controle obtido no tratamento com fungicida, evidenciando o potencial do controle biológico como uma alternativa promissora no manejo da antracnose (Christmann, 2022).

Os tratamentos apresentaram diferenças significativas quanto à qualidade fisiológica. Em relação à primeira contagem de germinação, os tratamentos utilizando óleo essencial isolado, *C. rosea* e fungicida apresentaram os melhores resultados, não diferindo da testemunha (Tabela 9). Para a germinação, os tratamentos com óleo essencial e *C. rosea*, isolados e combinados e fungicida resultaram nas melhores médias, não diferindo da testemunha. Em contrapartida, os tratamentos compostos por OE + *T. harzianum* e *T. harzianum* isolado, apresentaram resultados inferiores em relação aos demais e à testemunha, tanto para primeira contagem de germinação quanto para a germinação final (Tabela 9).

Diferentes estudos corroboram os resultados do presente trabalho. O óleo essencial de cravo não interferiu negativamente na germinação nem no vigor das sementes de sementes crioulas de milho (Dias *et al.*, 2021). Os óleos essenciais de

copaíba e cravo-da-índia promoveram aumento no potencial germinativo das sementes de feijão-fava (Gomes *et al.*, 2016).

Por outro lado, o tratamento de sementes de milho com óleo essencial de cravo, na concentração de  $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ , afetou negativamente a qualidade fisiológica das sementes, enquanto o óleo essencial de hortelã, na concentração de  $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ , promoveu aumento na porcentagem de germinação, evidenciando que a ação dos óleos essenciais varia de acordo com sua composição química e a concentração empregada (Gomes *et al.*, 2023).

**Tabela 9 – Primeira contagem de germinação (PCG), germinação, plântulas anormais e sementes mortas de sementes de soja submetidas ao tratamento com óleo essencial (OE) de cravo-da-índia, antagonistas e fungicida.**

| TRATAMENTOS                       | PCG (%) | Germinação (%) | Plântulas anormais (%) | Sementes mortas (%) |
|-----------------------------------|---------|----------------|------------------------|---------------------|
| Testemunha                        | 91,0 a  | 96,0 a         | 2,0 c                  | 2,0 b               |
| OE cravo-da-índia                 | 85,0 a  | 96,0 a         | 4,0 c                  | 0,0 c               |
| OE + <i>Trichoderma harzianum</i> | 23,0 d  | 23,0 c         | 73,0 a                 | 5,0 a               |
| OE + <i>Clonostachys rosea</i>    | 67,0 b  | 89,0 a         | 7,0 c                  | 3,0 b               |
| <i>Trichoderma harzianum</i>      | 45,0 c  | 53,0 b         | 42, b                  | 3,0 b               |
| <i>Clonostachys rosea</i>         | 85,0 a  | 94,0 a         | 4,0 c                  | 2,0 b               |
| Standak® Top                      | 85,0 a  | 96,0 a         | 4,0 c                  | 1,0 c               |
| p-valor                           | 0,0001* | 0,001*         | 0,001*                 | 0,003*              |

\*- Significativo a 5% de probabilidade. Medianas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P > 0,05$ ).

No tratamento de sementes de soja com produtos químicos, biológicos e alternativos visando o controle de *C. truncatum*, Siqueira *et al.* (2024) verificaram que os tratamentos com carbendazim + thiram e óleo essencial de cravo-da-índia resultaram nas melhores porcentagens de germinação (94,5% e 90,5%, respectivamente). Em contrapartida, os produtos biológicos resultaram em valores inferiores, sendo o tratamento com *T. harzianum* semelhante à testemunha e a associação de antagonistas (*T. harzianum* + *Trichoderma asperellum* + *Bacillus amyloliquefaciens*) inferior. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Na microbiolização de sementes de soja com 25 isolados de *Trichoderma spp.*, nove isolados proporcionaram maiores porcentagens de germinação, com

diferença significativa em relação à testemunha, enquanto quatro isolados proporcionaram as menores médias de germinação (Kraemer, 2022).

Sabe-se que o tratamento de sementes com microrganismos de biocontrole, por empregar seres vivos, pode gerar diferentes respostas e, eventualmente, provocar danos à germinação. A ação de *Trichoderma* spp. está associada a diversos efeitos, destacando-se a assimilação de nutrientes, desenvolvimento vigoroso do sistema radicular e mecanismos de ação como a indução de resistência e a produção de fitohormônios reguladores de crescimento (Kraemer, 2022). Sendo assim, a resposta para a promoção de germinação de sementes por isolados de *Trichoderma* spp. não está associada apenas ao controle direto dos patógenos (Lucon, 2009).

Embora o estímulo ao desenvolvimento do antagonista seja benéfico para o controle do patógeno, este pode resultar em uma interação mais agressiva com as sementes, refletindo negativamente na qualidade fisiológica. Por este motivo, o efeito do óleo essencial sobre o antagonista deve ser analisado cuidadosamente, o que torna necessária a realização de estudos adicionais para investigar os impactos dessa interação.

Em relação às plântulas anormais e às sementes mortas, o tratamento OE + *T. harzianum* diferiu dos demais, resultando em maior porcentagem para ambas as variáveis (Tabela 9). Determinadas espécies de *Trichoderma* podem ocasionar o apodrecimento de sementes de tomate quando estas entram em contato com o fungo em ambientes com alta umidade, favorecendo seu crescimento sobre as sementes e deteriorando as mesmas (Montalvão *et al.*, 2020).

Os efeitos negativos sobre a qualidade fisiológica de sementes são, basicamente, demonstrados por meio da redução na porcentagem de germinação e o aumento de plântulas anormais e sementes mortas (Toledo *et al.*, 2020). Sendo assim, é possível inferir que a combinação do óleo essencial de cravo-da-índia com o antagonista *T. harzianum* comprometeu a qualidade fisiológica das sementes de soja, nas condições em que foi conduzido o presente estudo. É possível, ainda, que o óleo essencial tenha potencializado o efeito do *Trichoderma*, intensificando a ação negativa sobre o desempenho fisiológico das sementes.

Para as variáveis comprimento de parte aérea e raiz, os tratamentos com óleo essencial de cravo-da-índia e fungicida apresentaram as melhores médias,

diferindo significativamente dos demais tratamentos e da testemunha (Tabela 10). Em relação ao peso de massa seca de plântulas, não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha (Tabela 10).

Corroborando o presente estudo, foi observado um incremento no comprimento da parte aérea de plântulas provenientes de sementes de soja tratadas com óleo essencial de cravo-da-índia, cujas médias foram superiores às da testemunha e estatisticamente semelhantes às dos tratamentos com produtos químicos (Siqueira *et al.*, 2024).

**Tabela 10 – Comprimento de parte aérea (CPA) e de raiz (CRA) e peso de massa seca (PMS) de plântulas de soja submetidas ao tratamento de sementes com óleo essencial (OE) de cravo-da-índia, antagonistas e fungicida.**

| TRATAMENTOS                       | CPA (cm) | CRA (cm) | PMS (mg/plântula)   |
|-----------------------------------|----------|----------|---------------------|
| Testemunha                        | 12,16 b  | 16,53 b  | 0,125 a             |
| OE cravo-da-índia                 | 14,52 a  | 20,68 a  | 0,119 a             |
| OE + <i>Trichoderma harzianum</i> | 6,83 d   | 11,25 d  | 0,123 a             |
| OE + <i>Clonostachys rosea</i>    | 10,46 bc | 14,43 c  | 0,117 a             |
| <i>Trichoderma harzianum</i>      | 6,33 d   | 13,60 c  | 0,128 a             |
| <i>Clonostachys rosea</i>         | 8,37 cd  | 14,06 c  | 0,120 a             |
| Standak® Top                      | 16,67 a  | 20,06 a  | 0,120 a             |
| p-valor                           | 0,0001*  | 0,0001*  | 0,795 <sup>NS</sup> |

\*- significativo a 5% de probabilidade; <sup>NS</sup>- não significativo. Medianas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P > 0,05$ ).

O tratamento de sementes de leucena com diferentes óleos essenciais resultou em aumento do crescimento radicular das plântulas quando utilizados os óleos essenciais de sementes de uva e cravo, superando, inclusive, o desempenho observado no tratamento com fungicida (Olinto *et al.*, 2021).

A aplicação de produtos biológicos à base de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus* spp. e *Coniothyrium minitans* no tratamento de sementes de soja para o controle de *Rhizoctonia solani* resultou em menor desenvolvimento das plântulas quando utilizado *T. harzianum*, apresentando as menores médias de comprimento da parte aérea e das raízes, sem diferença estatística em relação ao tratamento com *C. minitans*. Além disso, os tratamentos com *T. harzianum* mostraram-se ineficazes no controle do patógeno e, comparados à testemunha inoculada, comprometeram o desenvolvimento das plântulas (Les *et al.*, 2020).

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, pode-se concluir que:

- a) O óleo essencial de cravo-da-índia é eficiente na inibição do desenvolvimento *in vitro* de *Colletotrichum truncatum* a partir da concentração 0,10%.
- b) A técnica de aspersão promoveu menos danos físicos às sementes de soja em comparação à imersão, sendo, portanto, considerada a mais adequada.
- c) Os antagonistas *Trichoderma harzianum* e *Clonostachys rosea* controlaram, *in vitro*, o patógeno *Colletotrichum truncatum*.
- d) A integração do óleo essencial com esses antagonistas foi eficaz no controle de *Colletotrichum truncatum* nas sementes, embora a associação com *Trichoderma harzianum* tenha prejudicado a qualidade fisiológica das sementes, indicando a necessidade de ajustes na aplicação, uma vez que esse antagonista geralmente promove controle eficiente e melhorias na qualidade fisiológica das sementes tratadas.



## REFERÊNCIAS

- ACHIMÓN, F.; BRITO, V. D.; PIZZOLITTO, R. P.; SANCHEZ, A. R.; GÓMEZ, E.A.; ZYGADLO, J.A. Chemical composition and antifungal properties of comercial essential oils against the maize phytopathogenic fungs *Fusarium verticillioides*. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 53, n. 4, p. 292-303, 2021.
- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- ARAÚJO, A. C.; TOLEDO, E. D.; SOARES, W. R. O. Produtos alternativos no controle de *Colletotrichum spp.* isolados de manga e banana. **Científica Multidisciplinary Journal**, v. 5, n. 3, p. 104-112, 2018.
- ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Cadernos de Pesquisa**, v. 20, n. especial, p. 137-144, 2013.
- ASCOLI, C.; VIANA, J. L.; PEREIRA, C. S.; FIORINI, I. V. A.; SILVA, A. A. Physiological potential of soybean seed and your relationship with seedling emergence in the field. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 5, p. 104–108, 2018.
- BARBOSA, G. G.; COSTA, F. A.; COSTA, A. C.; ULHOA, C. J. Avaliação do potencial de isolados de *Trichoderma spp.* nativos do estado de Mato Grosso do Sul contra o fungo *Colletotrichum musae*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 29484-29502, 2021.
- BARROS, D. M.; MOURA, D. M.; MONTE, Z. S.; RIBEIRO, A. N. S. Atividades biológicas do eugenol e sua potencial utilização na conservação dos alimentos. **Revista Contemporânea**, v. 4, n.6, p. 01-19, 2024.
- BASAK S.; GUHA P. Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. **Food Science and Technology**, v. 75, p. 616–623, 2017.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. “In vitro” antagonism of *Trichoderma species* against six fungal Plant Pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 79-379, 1982.
- BENNETT, A. J.; WHIPPS, J. M. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during drum priming. **Biological Control**, v. 44, n. 3, p. 349-361, 2008.
- BESTEN, M. A.; JASINSKI, V. C. G.; COSTA, G. L. C.; NUNES, D. S.; SENS, S. L.; WISNIEWSKI, JR., A.; SIMIONATTO, E. L.; RIVA, D.; DALMARCO, J. B.; GRANATO, D. Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female specimens of each five *Baccharis* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 6, 2012.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M. Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: proposta metodológica. **Comunicado Técnico 59**, Brasília: Embrapa Meio Ambiente. 1ª Ed. 15p. 2022.

BETTIOL, W.; PINTO, Z. V.; SILVA, J. C.; FORNER, C.; FARIA, M. R.; PACIFICO, M. G.; COSTA, L. S. A. S. Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma**: uso na agricultura. Brasília: Embrapa, 2019. p. 45-160.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas**: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.

BOCCHI, S. Management of soybean anthracnose by genetic resistance and fungicide application. **Crop Protection**, v.12, n. 3, p. 89-96, 2019.

BONNA, T. D. M. M. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 411-418, 2012.

BOREL, F. C. **Interação de *Clonostachys rosea* e *Sclerotinia sclerotiorum* no solo e em plantas de soja e feijão**. 2014. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2014.

BORGES, Á. V.; SARAIVA, R. M.; MAFFIA, L. A. Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 71-76, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. **Anexo XXIII** – Padrões para produção e comercialização de sementes de soja (*Glycine Max* L.), 17 set. 2013. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/copy\\_of\\_INN45de17desetembrode2013.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/copy_of_INN45de17desetembrode2013.pdf). Acesso em: 28 mar. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília: MAPA-ACS, 2009a. 200p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009b. 399p.

CADENA, M. B.; PRESTON, G. M.; VAN DER HOORN, R. A L.; FLANAGAN, N. A.; TOWNLEY, H. E.; THOMPSON, I. P. Enhancing cinnamon essential oil activity by nanoparticle encapsulation to control seed pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 755-764, 2018.

CARVALHO, E. M. S. **Antracnose em feijão-fava: caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum***. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia – Proteção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 42, p. 225-226, 1939.

CASTILHO, G. K.; FELISBINO, S. S.; RODRIGUES, N. M. Estudo sobre os tipos de extração para óleos essenciais e óleos vegetais. **Revista Científica Multidisciplinar O Saber**, v. 10, p. 01-08, 2021.

CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017.

CHATTOPADHYAY, C.; KOLTE, S. J.; WALIYAR, F. Soybean diseases. In: CHATTOPADHYAY, C.; KOLTE, S. J.; WALIYAR, F. **Diseases of edible oilseed crops**. New York: CRC Press, 2015. p. 359-421.

CHRISTMANN, P. E. T. P. **Controle biológico da antracnose na cultura do feijão com espécies de *Trichoderma***. 2022. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2022.

COELHO, A. P. F.; ARAUJO, E. F.; SILVA, C. S.; LISBOA, C. F.; SANTOS, S. G. F. Controle alternativo de fitopatologias: uso de óleos essenciais no tratamento sanitário de sementes. **Contribuciones a las ciencias sociales**, v. 16, n. 9, p. 13857-13878, 2023.

COLLI, M. **Potencial do óleo essencial de capim-camelo (*Cymbopogon schoenanthus*), BISFP, Timorex Gold e Trichodermil sc. no controle dos patógenos *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (*Glycine max*) via tratamento de sementes**. 2022. Dissertação (Mestre em Ciências Agrárias) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2022.

CONAB – Companhia Nacional De Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 12, safra 2024/25, n. 7 – Sétimo levantamento. Abril 2025. 129p. Disponível em: [www.conab.org.br](http://www.conab.org.br). Acesso em: 15 abr. 2025.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRIGUEZ, L.; DEL-VAL, E.; LARSEN, J. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 4, p. 1-17, 2016.

CORRÊA, O. B.; MELO, A. R.; MARQUES, C. R. M. Análise de diferentes métodos de extração de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Vincci**, v. 8, n. 2, p. 261-281, 2023.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de

*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

COSTA, J. P. **Estudo do potencial bioestimulante do óleo essencial de cravo da índia no tratamento de sementes de soja**. 2023. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba, 2023.

COTA, L. V.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; MACEDO, P. E. F.; ANTUNES, R. F. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological Control**, v. 46, n. 3, p. 515-522, 2008.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H. **O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, 1. Ed., 2015. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1015627/1/Controlebiologico.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2025.

CUNHA, A. L. A.; FERREIRA, T. C. Patologia de sementes na atualidade: revisão bibliométrica. **Holos**, v. 1, n. 37, p.1-19, 2021.

DARONCO, M. V. **Óleos essenciais no tratamento de sementes de soja (*Glycine max* L.)**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2013.

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

DIAS, F. H. C.; NUNES, M. S.; SILVA, E. C.; SILVA, E. G. F.; SILVA, H. F.; NASCIMENTO, L. C. Effect of essential oils on the health and physiological quality of creole corn seeds. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 9, p. 10-18, 2021.

DIAS, M. D. **Etiologia, diversidade do agente causal e controle químico da antracnose da soja**. 2014. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impacto of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 18-23, 2016.

DOMENE, M. P.; GLÓRIA, E. M.; BIAGI, J. D.; BENEDETTI, B. C.; MARTINS, L. Efeito do tratamento com óleos essenciais sobre a qualidade fisiológica e sanitária das sementes de milho (*Zea mays*). **Plant Pathology**, v. 83, p. 1-6, 2016.

DUKE, S. O.; CANTRELL, C. L.; MEEPAGALA, K. M.; WEDGE, D. E.; TABANCA, N.; SCHRADER, K. K. Natural toxins for use in pest management. **Toxins**, v. 2, p. 1943-1962, 2010.

EMBRAPA. **Pesticidas biológicos cresceram 45% no Brasil nos últimos cinco anos.** Embrapa Meio Ambiente, 2024. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/87248594/pesticidas-biologicos-cresceram-45-no-brasil-nos-ultimos-cinco-anos>. Acesso em: 28 abr. 2025.

FANTINEL, V. S.; MUNIZ, M. F. B.; BAPTISTA, P.; SANTOS, S.; PEREIRA, J. A.; MARTINS, F.; CIOTTA, M. N.; POLETTO, C.; DA SILVA, J. C. P. Endophytic fungal communities isolated from two genotypes of feijoa fruits (*Feijoa sellowiana* O. Berg.) and prospection of potential agents against anthracnose pathogens. **Biological Control**, v. 184, 2023.

FARIAS, O. R.; CRUZ, J. M. F. L.; DUARTE, I. G. Controle *in vitro* de *Colletotrichum truncatum* do feijão fava (*Phaseolus lunatus*) por *Trichoderma* spp. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 12, p. 1-6, 2020.

FERREIRA-OLIVEIRA, L.; BONALDO, S. M.; PEREIRA, C. S.; FIORINI, I. V. A.; BELUFI, L. M. R.; PITTELKOW, F. K. Programas de fungicidas no controle de antracnose na cultura da soja. **Tecno-Lógica**, v. 25, n. 2, p. 209-220, 2021.

FLÁVIO, N. S. D. S.; SALES, N. L. P.; AQUINO, C. F.; SOARES, E. P. S.; AQUINO, L. F. S.; CATÃO, H. C. R. M. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 7-20, 2014.

FONTES, A. V. **Processo de industrialização da soja no Brasil.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Importância do uso de sementes de soja de alta qualidade. **Folder n.01/2010**, Londrina: Embrapa Soja, 2010.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.

FUKUYAMA, C. W. T.; BREXÓ, R. P.; DUARTE, L. G. R.; MARTINS, M. E. M.; ASTOLFO, M. E. A.; OSTI, Y. G. P.; PEDRINO, I. C.; SANTOS, H. V.; OLIVEIRA FILHO, J. G.; PROCOPIO, F. R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; FERREIRA, M. D. Impacto of essential oils composition and exposure methods on fungal growth and morphology: insights for postharvest management. **Future Postharvest and Food**, v. 2, n. 2, p. 159-173, 2025.

GALLI, J.A.; PANIZZI, R.C.; VIEIRA, R.D. Efeito de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Phomopsis sojae* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 40-46, 2007.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.

GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; SOARES, R. M.; SEIXAS, C. D. S.; DIAS, W. P.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M.; HENNING, A. A.; Doenças da soja. **Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Londrina: Embrapa Soja, 2014. 32p.

GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.; DIAS, W. P.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; HENNING, A. A.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; SILVA, J. F. V. Doenças da Soja. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 5. Ed., v. 2, 2016. p. 657-675.

GOMES, J. V. P.; MATOS JUNIOR, E. L.; CARVALHO, H. P.; FERREIRA, S. Germinação e crescimento de plântulas de milho submetidas ao tratamento de sementes com óleos essenciais. *In*: JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO IFSULDEMINAS, 15., 2023, Inconfidentes. **Anais: 15ª Jornada Científica e Tecnológica e 12º Simpósio de Pós-Graduação**. Inconfidentes: Instituto Federal do Sul de Minas, 2023. p. 4. Disponível em: <https://josif.ifsuldeminas.edu.br/ojs/index.php/anais/article/view/758>. Acesso em: 10 mai. 2025.

GOMES, R. S. S.; NUNES, M. C.; NASCIMENTO, L. C.; SOUZA, J. O.; PORCINO, M. M. Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 279-287, 2016.

GONÇALVES, G. G.; MATTOS, L. P. V.; MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 102-107, 2009.

GONÇALVES, R. C. Efficacy of fungicides for control of soybean anthracnose in field conditions. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 38- 43, 2014.

GOUVEIA, A. B. V. S.; DE PAULO, L. M.; SILVA, J. M. S.; SOUSA, F. E.; SANTOS, F. R.; MINAFRA, C. S. Subprodutos da soja na alimentação de aves: Revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, 2020.

GRIGOLLI, J. F. J. Manejo de doenças na cultura da soja. *In*: PITOL, C.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; GITTI, D. C.; LOURENÇÃO, A. L. F. **Tecnologia e Produção: Soja 2014/2015**. Curitiba: Midiograf, 2015. p. 146-156. Disponível em: [www.fundacaoms.org.br/wp-content/uploads/2021/02/Tecnologia-Producao-Soja-20142015.pdf](http://www.fundacaoms.org.br/wp-content/uploads/2021/02/Tecnologia-Producao-Soja-20142015.pdf). Acesso em: 28 abr. 2025.

GUERRA, M. S.; BARBOSA, M. S.; VIEIRA, G. H. C. Uso de óleos essenciais no controle do fungo *Colletotrichum orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx (1957). **Acta Biológica Catarinense**, v. 8, n. 3, p. 4-12, 2021.

GUTIÉRREZ, R. A.; RUBIO, L. D.; SOTO, M. M.; VÁZQUEZ, M. P. H.; GUERRERO, I. C. Applications of plant essential oils in pest control and their encapsulation for controlled release: a review. **Agriculture**, v. 14, p. 1-27, 2024.

HENNING, A. A. Patologia e tratamento de sementes: noções gerais. **Documentos 264**, Londrina: Embrapa Soja, 52p. 2005.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 78p. Disponível em: [www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/991687/manual-de-identificacao-de-doencas-de-soja](http://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/991687/manual-de-identificacao-de-doencas-de-soja). Acesso em: 18 fev. 2025.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

HOSSEN, D. C.; CORRÊA JÚNIOR, E. S.; GUIMARÃES, S.; NUNES, U. R.; GALON, L. Tratamento químico de sementes de trigo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 104-109. 2014.

HYDE, K.; CAI, L.; CANNON, P.; CROUCH, J.; CROUS, P.; DAMM, U.; GOODWIN, P.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.; JONES, E.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T. D.; SILVA, J. P. D.; MELLO, S. C. M. D. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

JESUS, S. F. **Controle de fungos fitopatogênicos por meio da validação de óleos essenciais (ensaio *in vitro*)**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciado em Ciências Biológicas) – Instituto Federal Goiano, Ceres. 2023.

JU, J.; LEI, Y.; GUO, Y.; YU, H.; CHENG, Y.; YAO, W. Eugenol and citral kills *Aspergillus niger* through the tricarboxylic acid cycle and its application in food preservation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 173, 114226, 2023.

KRAEMER, A. P. N. **Avaliação do potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças da soja e no tratamento de sementes**. 2022. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Instituto Federal Goiano, Urutaí, 2022.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura. **Circular Técnica (136)**. Londrina: Embrapa Soja, 2018.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B.; MARCOS-FILHO, J. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 2020. 601p.

KUMAR, V.; KOUL, B.; TAAK, P.; YADAV, D.; MINSEOK, C. Journey of *Trichoderma* from pilot scale to mass production: a review. **Agriculture**, v. 13, p.1-37, 2023.

LES, N.; HENNEBERG, L.; NADAL, V. G. R.; MULLER, M.; SZEMOCOWIAKI, A. G.; CARNEIRO, F. T.; JACCOUD FILHO, D. S. Controle de *Rhizoctonia solani* com feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 2, p. 124-133, 2020.

LIMA, C. B.; VILLELA, T. T. Efeito dos óleos essenciais de alho e laranja e do surfactante Tween® 80 sobre a germinação de sementes de manjerição. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 15, n. 2, p. 84-91, 2017.

LIMA, C. B.; RENTSCHLER, L. L. A.; BUENO, J. T.; BOAVENTURA, A. C. Plant extracts and essential oils on the controlo f *Alternaria alternata*, *Alternaria dauci* ando on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.). **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 764-770, 2016.

LIMA, T. S. **Potencial do óleo essencial de cravo da Índia sobre fungos fitopatogênicos em sementes de milho**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2019.

LIMA, T. S.; FRANÇA, K. R. S.; SILVA, J. L.; SANTOS, A. B.; COSTA, J. F. O.; CARDOSO, T. A. L. Essential oil of clove (*Syzygium aromaticum*) to control *Sclerotium rolfsii* in vitro. **Revista Agro Ambiente**, v. 16, p. 1-11, 2022.

LOHMANN, G. T.; RABUSKE, J. M.; SAVIAN, L. G.; TONETTO, T. S.; MUNIZ, M. F. B. Ação antagônica de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Biológica Catarinense**, v. 9, n. 1, p. 25-35, 2022.

LOPES, A. C. A.; NASCIMENTO, W. M. Análise de sementes de hortaliças. **Circular Técnica (83)**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.; **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora: São Paulo, 2002.

LUCCA FILHO, O. A. Patologia de sementes. In: PESKE, S.T.; LUCCA FILHO, A.; BARROS, A.C.S.A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 2.ed. Pelotas, 2006. p.259-329.

LUCON, C. M. M. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. **Informações Tecnológicas**. 2009. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_1/trichoderma/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm). Acesso em: 10 mai. 2025.

LUCON, C. M. M.; CHAVES, A. L. R.; BACILIERI, S. **Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura**. São Paulo: Instituto Biológico, 1. Ed., 2014. 28p. Disponível em: <https://biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/files/pdf/cartilhas/trichoderma.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2025.

LUIZ, M. C.; SILVA, S. M. C.; SCAVACINI, A. T.; OLIVEIRA, A. L. R.; CUNHA, A. H. N. Velocidade de emergência de sementes de *Raphanus sativus* L. e *Eruca sativa* cultivadas em diferentes substratos orgânicos. **Revista Mirante**, v. 10, n. 1, 2017.

MACEDO, P. E. F. **Promoção do crescimento de plantas mediada por *Clonostachys rosea***. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MACHADO, A. Q.; CASSETARI NETO, D. Antracnose da soja no cerrado: diagnose e controle. **Boletim informativo**, Várzea Grande, n. 2, 16p. 2012.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MACHELEIDT, J.; MATTERN, D. J.; FISCHER, J.; NETZKER, T.; WEBER, J.; SCHROECKH, V.; VALIANTE, V.; BRAKHAGE, A. A. Regulation and role of fungal secondary metabolites. **Annual Review of Genetics**, v. 23, n. 50, p. 371-392, 2016.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015.

MAMARABADI, M.; JENSEN, D. F.; LUBECK, M. An N-acetyl-b-D-glucosaminidase gene, *cr-nag1*, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. **Mycological Research**, v. 113, n. 1, p. 33-43, 2009.

MARCELINO, W. L. **Potencial da taxtomina parcialmente purificada no controle de *Colletotrichum truncatum* e reação de cultivares da soja ao patógeno**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2019.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 362p.

MASCARIN, G. M.; SILVA, A. V. R.; SILVA, T. P.; KOBORI, N. N.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. *Clonostachys rosea*: Production by Submerged Culture and Bioactivity Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bemisia tabaci*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 851000, 2022.

MEDEIROS V. H. F.; BAVIA, P. G.; SEIXAS, S. D. C. Manejo de doenças fúngicas radiculares da soja. In: MEYER, C. M.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília: Embrapa, cap. 17, 2022. p. 297- 313.

MELLO, S. C. M.; ECKSTEIN, B.; MARQUES, E.; CARVALHO, D. D. C. Controle de doenças de plantas. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. p. 291-326.

MENTEN, J. O. M.; LIMA, L.; FRARE, V. C.; RABALHO, A. A. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamentos de sementes no Brasil. In: ZAMBOLIM, L. (Editor) **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005, p. 333-374.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**. v. 39, n. 1, p. 13-18, 2009.

MESQUITA, P. R. R.; NUNES, E. C.; SANTOS, F. N.; BASTOS, L. P.; COSTA, M. A. P. C.; RODRIGUES, F. M.; ANDRADE, J. B. Discrimination of *Eugenia uniflora* L. biotypes based on volatile compounds in leaves using HS-SPME/GC-MS and chemometric analysis. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 79-87, 2017.

MIGLIORINI, P.; KULCZYNSKI, S. M.; SILVA, T. A.; BELLÉ, C.; KOCH, F. Efeito do tratamento químico e biológico na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de canola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 788-801, 2012.

MONTALVÃO, S. C. L.; MARQUES, E.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. *Trichoderma* activity in seed germination, promoting seedling growth and rhizocompetence in tomato plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 10, p. 252-262, 2020.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2019. p. 181-199.

MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL W.; MORANDI M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa. 2009. p.139-152.

MORAIS, L. A. S.; RAMOS, N. P.; GONÇALVES, G. G.; BETTIOL, W.; CHAVES, F. C. M. Atividade antifúngica de óleos essenciais em sementes de feijão cv. carioquinha. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 6261-6266, 2008.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

MOURA, G. S.; PIETROBELLI, S. R.; OLIVEIRA, I. M. R.; OLIVEIRA, I. J.; FRANZENER, G. Óleo essencial de pitangueira na germinação e sanidade de sementes de variedades crioulas de feijoeiro. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 48-55, 2017.

NASCIMENTO, D. M. **Efeito do tratamento de sementes de pimentão com óleos essenciais sobre o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e o potencial fisiológico das sementes**. 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2017.

NASCIMENTO, D. M.; RIBEIRO-JUNIOR, M. R.; SANTOS, P. L. S.; PEREIRA, A. E.; KRONKA, A. Z. Óleos essenciais no tratamento de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 27, p. 77-90, 2021.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; GIANLUPPI, V.; PEREIRA, P. R. V. S. Antracnose (*Colletotrichum truncatum*): doença importante para a soja (*Glycine max*) nos cerrados de Roraima. **Comunicado Técnico 5**, Boa Vista: Embrapa Roraima, 5p. 2018.

NEVES, L. M.; VIEIRA, G. H. C. Efeito de óleos essenciais isolados de feijão sobre *Sclerotinia sclerotiorum* e determinação dessas substâncias na qualidade fisiológica e sanitária das sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 19, n. 2, p. 197-204, 2017.

NOBRE, S. A. M.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; COTA, L. V.; DIAS, A. P. S. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v. 34, n. 2, p. 132-143, 2005.

NOGUEIRA, A. P. O.; SEDIYAMA, T. BARROS, H. B.; TEIXEIRA, R. C. Morfologia, crescimento e desenvolvimento. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologia de produção e usos da soja**. Londrina: Macenas, 2009. cap. 2, p. 7-17.

NUR, A. Z., NOOR, A. B. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. **Annals of Agricultural Sciences**. v. 65, p. 168-178, 2020.

NYGREN, K.; DUBEY, M.; ZAPPARATA, A.; IQBAL, M.; TZELEPIS, G. D.; DURLING, M. B.; JENSENS, D. F.; KARLSSON, M. The mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* responds with both common and specific gene expression during interspecific interactions with fungal prey. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 6, p. 931-949, 2018.

OLINTO, F. A.; NUNES, M. S.; SILVA, L. G.; SILVA, H. F.; NASCIMENTO, L. C. Óleos essenciais sobre a qualidade de sementes de leucena. **Revista Principia**, v. 1, n. 54, p. 9-19, 2021.

OLIVEIRA, J. A.; SILVA, T. T. A.; VON PINHO, E. V. R.; ABREU, L. A. S. Secagem e armazenamento de sementes de sorgo com alto e baixo teor de tanino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 699-710, 2011.

OLIVEIRA, L. F.; BONALDO, S. M.; PEREIRA, C. S.; FIORINI, I. V. A.; BELUFI, L. M. R.; PITTELKOW, F. K. Programas de fungicidas no controle de antracnose na cultura da soja. **Tecno-Lógica**, v. 25, n. 2, p. 209-220, 2021.

ONS, L.; BYLEMANS, D.; THEVISSSEN, K.; CAMMUE, B. P. A. Combining biocontrol agents with chemical fungicides for integrated plant fungal disease control. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1930-1939, 2020.

PARÁISO, E. G.; BETTIOL, W.; MASCARIN, G. M. Multiplicação e formulação de *Clonostachys rosea* para controle biológico de mofo-cinza e promoção de crescimento vegetal em tomate. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE

INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CIIC, 16., 2022, Campinas. **Anais 16º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2022. p. 1-12. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1150534>. Acesso em: 03 mar. 2025.

PAREDES, S. R.; LEBEIS, S. L. Giving back to the community: microbial mechanisms of plant-soil interactions. **Functional Ecology**, v. 30, p. 1043-1052, 2016.

PARISI, J. J. D.; MEDINA, P. F. Tratamento de Sementes. **Informações tecnológicas – IAC**, Campinas, n. 81. 7p. 2013.

PIERRE, R. O. **Óleo essencial e extrato de cravo-da-índia no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da mancha manteigosa, em sementes e mudas de café**. 2009. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

POLITOSKI, F. **Transmissibilidade de patógenos em cultivares de soja, com diferentes tempos de exposição da semente com fungos**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2016.

POMELLA, A. Controle biológico: entraves e perspectivas. **Agroanalysis**, v. 34, n. 9, p. 41-42. 2014.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: Agiplan, 1985. 289p.

PURCELL, L. C.; SALMERON, M.; ASHLOCK, L. **Arkansas soybean production handbook: soybean growth and development**. Manhattan: Arkansas State University, 2014. cap. 2, p. 1-8. Disponível em: <https://www.uaex.uada.edu/publications/mp-197.aspx> Acesso em: 30 mar. 2025.

QUEIROZ, T. N.; PASCUALI, L. C.; SILVA, A. C. P.; PORTO, A. G.; CARVALHO, J. W. P. Extrato e óleos essenciais como alternativa no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* isolados de soja (*Glycine max* L.). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 737-753, 2020.

QUEVEDO, A. C.; MUNIZ, M. F. B.; SAVIAN, L. G.; SARZI, J. S.; SALDANHA, M. A. Ação antagonista “in vitro” de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum*. **Ciência Florestal**, v. 4, n. 32, 2022.

RABÊLO, W. F. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

RAINA, V. K.; SRIVASTAVA, S. K.; AGGARWAL, K. K.; SYAMASUNDAR, K. V.; KUMAR, S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 334-336, 2001.

REIS, D. N.; PINTO, H. A. P.; LIMA, R. P. Controle químico de antracnose da cultura da soja: uma revisão de literatura. **Revista Foco**, v. 16, n. 11, p. 1-14, 2023.

REZENDE, J. A. M.; MASSOLA Jr, N. S.; BEDENDO, I. P. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**, v. 1, 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. p. 37-58.

RICHETTI, A.; GOULART, A. C. P. Adoção e custo do tratamento de sementes na cultura da soja. **Comunicado Técnico 247**, Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 1 ed., 2018.

RODRÍGUEZ, M. A.; CABRERA, G.; GOZZO, F. C.; EBERLIN, M. N.; GODEAS, A. *Clonostachys rosea* BAFC3874 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.

SALES, G. O. S.; GOMES, R. S. S.; CARVALHO, T. K. N.; SANTOS, M. R.; MEDEIROS, J. G. F. Microbiolização de sementes de soja com *Trichoderma harzianum*: qualidade fisiológica e sanitária. **Nativa**, v. 11, n. 2, p. 220-225, 2023.

SANTANA, A. L.; SEGATO, S. V. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja tratadas com fungicida químico e microrganismos promotores de crescimento (*Trichoderma* spp. e *Azospirillum* spp.). **Nucleus**, v. 17, n. 2, p. 241-256, 2020.

SANTOS, M. V. O.; ARAÚJO, D. C. S.; SANTOS, T. R.; SILVA, S. D. V. M.; BEZERRA, J. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação de potenciais agentes fúngicos biocontroladores de *Phytophthora* spp. **Agrotrópica**, v. 26, n. 3, p. 185-196, 2014.

SANTOS, P. L.; **Manejo de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com óleos essenciais e antagonistas**. 2018. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2018.

SARAIVA, R. M.; FRANÇA, P. E.; BORGES, A. V.; MAFFIA, L. A. Uso e perspectiva de *Clonostachys rosea* como agente de biocontrole. **Revista de Ciências Agrícolas**, v. 31, n. 1, p. 78-91, 2014.

SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; GODOY, C. V.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M.; DIAS, W. P.; ALMEIDA, A. M. R. Manejo de doenças. In: SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. C. **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. cap. 10, p. 227-264.

SELL, C. Chemistry of essential oils. In: BASE, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils, science, technology and applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010. p.121-150.

SIDDIQUI, S. A.; ISLAM, R.; JAMAL, A. H. M.; PARVIN, T.; RAHMAN, A. Chemical composition and antifungal properties of the essential oil and various extracts of *Mikania scandens* (L.) Willd. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, s. 2, p. S2170-S2174, 2017.

SILVA JUNIOR, G.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 5. Ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres. 2018. p. 239-260.

SILVA, A. C.; SOUZA, P. E.; MACHADO, J. C.; SILVA, B. M.; PINTO, J. E. B. P. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum* infected soybean seeds. **Tropical Plant Pathology**. v. 37, n. 5, 2012.

SILVA, F. C. **Efeito *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de condimentos sobre fungos que ocorrem em pós-colheita em frutos de morango e mamão**. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SILVA, I. N.; CHRIST, A. J.; SILVA, S. S.; CARVALHO, J. W. P.; PASCUALI, L. C. Qualidade fisiológica de sementes de arroz tratadas com óleos essenciais e extratos vegetais. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 11, n. 3, p. 259-271, 2019.

SILVA, J. V. B.; GOMES, R. S. S.; CARVALHO, T. K. N.; LACERDA, A. V.; RODRIGUES, R. M.; MEDEIROS, J. G. F. Controle de patógenos em sementes de algodão com o uso de *Trichoderma harzianum*. **Nativa**, v. 10, n. 2, p. 204-210, 2022.

SILVA, M. S. L. **Principais doenças da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia) – Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2019.

SIQUEIRA, J. F.; VENTUROSOS, L. R.; CARDOSO, M. M.; NUNES, G. S.; BRANCO, J. S.; VENTUROSOS, L. A. C.; SILVA, F. S. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes salvas de soja submetidas a diferentes tratamentos. **Revista Observatório de la Economía Latinoamericana**, v. 22, n. 12, p. 01-26, 2024.

SOARES, M. G. S.; SILVA, H. F.; SILVA, E. C.; MELO, R. M.; NASCIMENTO, L. C. Physiological and sanitary quality of lima bean seeds treated with essential oils. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 55, p. 1-9, 2025.

SOLINO, A. J. D. S.; OLIVEIRA, J. B. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; ALENCAR, M. S. R.; RIBEIRO, L. M. Potencial antagonista e controle *in vitro* de *Alternaria solani* por fungos sapróbios. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 3, p. 199-204, 2017.

SOUZA, R. T. **Reação de cultivares e controle da antracnose em soja**. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Passo Fundo, 2009.

STANCK, J. A. T.; SANTOS, G. C.; TEIXEIRA JÚNIOR, J. B.; GRAF JÚNIOR, A. L.; ITAKO, A. T. Sanidade e germinação de sementes de *Mimosa scabrella* submetidas

a tratamento com óleos essenciais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 43, p. 1-7, 2023.

STEINDORFF, A. S.; SILVA, R. N.; COELHO, A. S. G.; NAGATA, T.; NORONHA, E. F.; OLHOA, C. J. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. **Biological Control**, v. 61, n. 2, p. 134–140, 2012.

SUN, Z. B.; LI, S. D.; REN, Q.; XU, J. L.; SUN, M. H. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 486-495, 2020.

SUN, Y.; SHUAI, L.; LUO, D.; BA, L. The inhibitory mechanism of eugenol on *Lasiodiplodia theobromae* and its induced disease resistance of passion fruit. **Agronomy**, v. 13, 1408, 2023.

SUTTON, J. C.; LI, D. W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITOSANHUENZA, R. M. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, v. 81, p. 316-328, 1997.

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

TICIANI, F. **Tratamento de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) com óleos essenciais**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenheiro Agrônomo) – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2013.

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CÉSAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de produtos biológicos no tratamento de sementes da cultura da soja. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 9919-9935, 2020.

VENTUROSOS, L. R. **Extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos à soja**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados. 2009.

VIEIRA FILHO, J. E. R. **A cadeia produtiva de soja e o desenvolvimento econômico e regional no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 27p. set. 2024. Disponível em: [https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/14781/1/TD3042\\_web.pdf](https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/14781/1/TD3042_web.pdf). Acesso em: 28 abr. 2025.

WORRALL, E. A.; HAMID, A.; MODY, K. T.; MITTER, N.; PAPPU, H. R. Nanotechnology for plant disease management. **Agronomy**, v. 8, n. 12, p. 285, 2018.

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

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; PIMENTEL, F. A.; GUIMARÃES, L. G. D. L.; SALGADO, A. P. S. P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 1, p. 193-198, 2009.

ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. 1 ed. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, 2005. v. 1. 502p.

ZEILINGER, S.; GRUBER, S.; BANSAL, R.; MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016.