

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O FUNGO *Phomopsis sojae* E A
QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA.**

PAULA LEITE DOS SANTOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU - SP
Fevereiro - 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O FUNGO *Phomopsis sojae* E A
QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA.**

PAULA LEITE DOS SANTOS

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Zanin Kronka

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU - SP
Fevereiro – 2014

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

Santos, Paula Leite dos, 1985-
S237e Efeito de óleos essenciais sobre o fungo *Phomopsis sojae*
e a qualidade fisiológica de sementes de soja / Paula Leite
dos Santos. - Botucatu : [s.n.], 2014
vi, 51 f. : tabs., fot. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014

Orientador: Adriana Zanin Kronka

Inclui bibliografia

1. Soja - Sementes - Qualidade. 2. Soja - Doenças e pragas. 3. Fitopatologia. 4. Fungos na agricultura. I. Kronka, Adriana Zanin. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O FUNGO *Phomopsis sojae* E A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE SOJA”

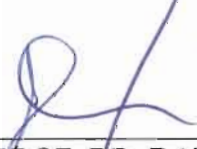
ALUNA: PAULA LEITE DOS SANTOS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ADRIANA ZANIN KRONKA

Aprovado pela Comissão Examinadora


PROFA. DRA. ADRIANA ZANIN KRONKA


PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO


PROF. DR. DANILA COMELIS BERTOLIN

Data da Realização: 28 de fevereiro de 2014.

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

OFEREÇO

DEDICO

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

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

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

*Ao meu amado namorado Guilherme,
Por todo amor, carinho, apoio e compreensão.*

Amo Vocês

AGRADECIMENTOS

À professora Adriana Zanin Kronka, pela orientação, amizade, confiança e incentivo. Sendo sempre muito dedicada, atenciosa, carinhosa e presente, um verdadeiro exemplo de profissionalismo.

À professora Marli Teixeira de A. Minhoni, pelo acolhimento, atenção, auxílio e carinho.

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

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

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

Aos professores Dr. José Carlos Barbosa e Dr. Sérgio do Nascimento Kronka, pelo auxílio nas análises estatísticas.

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

À querida Valéria Giandoni, pelo carinho, atenção e principalmente pelos ensinamentos transmitidos, sendo fundamental para a conclusão deste trabalho.

À querida Gleice Viviane Nunes Pereira, pelo companheirismo, amizade, apoio, confiança, por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre muito atenciosa, carinhosa e meiga. Por ter sido imprescindível na execução deste trabalho.

À Patrícia Leite Cruz, pela amizade, apoio, auxílio, carinho, dedicação. Pelas palavras de conforto, que por muitas vezes necessitei.

À Letícia Inoue e Tássia Campanhã, pela grande amizade, amor e carinho. Por sempre acreditarem em minha capacidade, me apoiando em todos os passos de minha vida.

À amada Maiara Bernardes, por ser sempre presente em minha vida, estando ao meu lado em todos os momentos, te amo minha amiga.

À minha querida Rafaela Morando, por sua amizade, carinho, alegria e atenção. Por ter me auxiliado em algumas etapas da execução deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Proteção Vegetal, Ivaninha, Marília, Laís, Cris, Késsia, Marcelo, Ronaldo, Júlio e Ricardo, pelos momentos de descontração e carinho.

Aos colegas do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal, Rubiana, Camila, Juliana, Thiago e Pedro, por todo o apoio durante a execução dos experimentos lá conduzidos.

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1. Doenças na cultura da soja e transmissão de patógenos via sementes.....	8
2.1.1. <i>Phomopsis sojae</i>	9
2.2. Tratamento de sementes.....	11
2.3. Produtos naturais no manejo de doenças de plantas.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Efeito <i>in vitro</i> de óleos essenciais no desenvolvimento de <i>Phomopsis sojae</i> ...	19
3.2. Efeito do tratamento de semente com óleos essenciais sobre a incidência de <i>Phomopsis sojae</i> e o potencial fisiológico das sementes.....	21
3.2.1. Obtenção de sementes infectadas com <i>Phomopsis sojae</i>	21
3.2.2. Tratamento das sementes.....	22
3.2.2.1 Avaliação da sanidade das sementes.....	22
3.2.2.2 Avaliação do potencial fisiológico das sementes.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Efeito <i>in vitro</i> de óleos essenciais no desenvolvimento de <i>Phomopsis sojae</i> ...	25
4.2. Efeito do tratamento de semente com óleos essenciais sobre a incidência de <i>Phomopsis sojae</i> e o potencial fisiológico das sementes.....	32
4.2.1. Efeito do tratamento na sanidade de sementes.....	32
4.2.2. Efeito do tratamento no potencial fisiológico das sementes.....	33
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Efeito de óleos essenciais e do fungicida tiofanato metílico + fluazinam no crescimento <i>in vitro</i> e porcentagem de inibição de crescimento (PIC) de <i>Phomopsis sojae</i> . Botucatu, SP, 2014.....	27
Tabela 2: Efeito de óleos essenciais na esporulação de <i>Phomopsis sojae</i> . Botucatu, SP, 2014.....	28
Tabela 3: Incidência de <i>Phomopsis sojae</i> em sementes de soja BMX Potência RR, submetidas ao tratamento com óleos essenciais. Botucatu, SP, 2014.....	32
Tabela 4: Germinação de sementes de soja BMX Potência RR, submetidas ao tratamento com óleos essenciais. Botucatu, SP, 2014.....	34
Tabela 5: Primeira contagem de germinação de sementes e comprimento de plântulas de soja BMX Potência RR, submetidas ao tratamento com óleos essenciais. Botucatu, SP, 2014.....	37
Tabela 6: Índice de velocidade de emergência (IVE), emergência final, altura e massa seca de plântulas de soja BMX Potência RR, oriundas de sementes submetidas ao tratamento com óleos essenciais. Botucatu, SP, 2014.....	37

RESUMO

Dentre os diversos fungos presentes em sementes de soja, *Phomopsis sojae* é apontado como o mais diretamente envolvido na redução da qualidade das sementes. Apesar da comprovada eficiência dos produtos químicos, a agricultura moderna tem buscado formas alternativas para o tratamento de sementes e o controle de doenças, de modo geral, que visem uma maior preservação ambiental. Nesse contexto, o emprego de substâncias naturais com ação fungicida surge como uma opção de baixo impacto ecológico e ambiental. Diversas espécies vegetais já mostraram efeito positivo no controle de doenças de plantas, sugerindo sua potencialidade também no tratamento de sementes. Para ser uma prática viável, o emprego de substâncias naturais no tratamento de sementes, além de reduzir ou controlar a população microbiana das sementes, não pode ter efeito negativo sobre a fisiologia das sementes, prejudicando sua germinação e vigor. Diante do exposto, o objetivo da presente pesquisa foi verificar a possibilidade de emprego de óleos essenciais de diferentes espécies vegetais no tratamento de sementes, visando o controle de *Phomopsis sojae*, e avaliar também o efeito destes produtos sobre a qualidade fisiológica das sementes tratadas. Na primeira etapa, com experimentos realizados em duplicata, foi testado o efeito *in vitro* de óleos essenciais de oito espécies vegetais (nim, capim-limão, citronela, alecrim, eucalipto citriodora, cravo, gengibre e manjerição) em

quatro concentrações (0,25%; 0,5%; 0,75% e 1,0%), sobre o crescimento e esporulação do fungo. Para fins de comparação do desempenho destes, foram adicionadas duas testemunhas, uma composta de meio de cultura puro e outra, de meio com fungicida (tiofanato metílico + fluazinam). Os óleos com melhor efeito inibitório foram capim-limão, cravo e manjerição. Estes foram, então, utilizados na etapa seguinte, que consistiu no tratamento de sementes, com os óleos sendo aplicados em duas concentrações (0,25% e 0,5%), visando avaliar o efeito sobre incidência de *P. sojae* nas sementes e a qualidade fisiológica destas. Foram incluídas duas testemunhas, uma constituída de sementes inoculadas e outra, de sementes não inoculadas, ambas sem nenhum tratamento. A sanidade foi avaliada pelo método do papel de filtro. Quanto à qualidade fisiológica, foram avaliados: germinação, primeira contagem de germinação, comprimento de plântulas e índice de velocidade de emergência e desenvolvimento de plântulas (comprimento e massa seca) em casa de vegetação. Os óleos essenciais de capim-limão, cravo e manjerição mostraram efeito satisfatório no controle do fungo e não influenciaram na qualidade fisiológica das sementes, mostrando um potencial de uso no tratamento de sementes.

Palavras-chave: *Glycine max*, patologia de sementes, controle alternativo, germinação, vigor.

EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON THE FUNGUS *Phomopsis sojae* AND PHYSIOLOGICAL QUALITY OF SOYBEAN SEEDS. Botucatu, 2014. 51p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista.

Author: PAULA LEITE DOS SANTOS

Adviser: ADRIANA ZANIN KRONKA

SUMMARY

Among many fungi present in soybean seeds, *Phomopsis sojae* is named as the most directly involved in the reduction of seed quality. Despite the proven effectiveness of chemicals products, modern agriculture has sought alternative methods for seed treatment and control of diseases, in general, an effort to further environmental preservation. In this context, the use of natural substances with fungicidal action appears as an option of low ecological and environmental impact. Several plant species have already shown a positive effect in controlling plant diseases, suggesting its potential also for seed treatment. To be a viable practice, the use of natural substances in seed treatment, in addition to reduce or control the microbial population of seeds, may not have a negative effect on the physiology of the seeds impairing their germination and vigor. Thus, the objective of this research was to verify the possibility of using essential oils from different plant species in seed treatment aiming to control *P. sojae* and also evaluate the effect of these products on the physiological quality of the treated seeds. In the first stage, with experiments performed in duplicate, the in vitro effect of essential oils from eight plant species (neem, lemongrass, citronella, rosemary, lemon eucalyptus, cloves, ginger and basil) was tested at four concentrations (0,25 %, 0,5%, 0,75% and 1,0%) on the growth and sporulation. For comparative purposes of their performance, two control samples were included, one composed of pure culture medium were added and another of medium with fungicide (thiophanate methyl + fluazinam). The oils with better inhibitory effect were lemongrass, cloves and basil. These oils were then used in the next stage, consisting in treating the seeds with the oils being applied in two concentrations (0,25% and 0,5%) in order to evaluate the effect on the incidence of *P. sojae* in seeds and the physiological quality of these. Two control samples were included, one composed of inoculated seeds and another of non-inoculated seeds, both without any treatment. Seed sanitary quality was

evaluated by the blotter test. Regarding the physiological characteristics, were evaluated. Regarding the physiological characteristics were evaluated: germination, first germination counting, seedling length and speed index of emergency and seedling development (length and dry matter) in greenhouse. The essential oils of lemongrass, clove and basil showed satisfactory effect in controlling the fungus and did not affect the physiological quality of seeds, showing a potential use as a seed treatment.

Keywords: *Glycine max*, seed pathology, alternative control, germination, vigor.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] ocupa posição de destaque no cenário agrícola nacional, tendo apresentado, nas últimas décadas, uma expansão da cultura, não só em termos de área cultivada nas regiões tradicionais de cultivo, como também um avanço desta cultura para novas regiões. Paralelamente à expansão da cultura, surgiu uma série de problemas de ordem fitossanitária, fazendo com que várias doenças de importância econômica também aumentassem, tanto em número quanto em intensidade.

As sementes de soja podem contribuir consideravelmente para os prejuízos decorrentes de doenças na lavoura, pois representam um importante veículo de disseminação e sobrevivência de muitos patógenos. Dentre os patógenos que podem ter influência negativa, se presentes nas sementes, está o fungo *Phomopsis sojae*, agente causal da seca da haste e da vagem ou phomopsis da semente. Este fungo é apontado, por muitos pesquisadores, como o principal responsável pelo descarte de lotes de soja. Por esse motivo, fica evidenciada a importância da utilização de sementes com boa qualidade sanitária e fisiológica na instalação de uma lavoura.

O tratamento de sementes é uma prática empregada no manejo integrado de doenças que visa erradicar ou reduzir, aos mais baixos níveis possíveis, os

fungos presentes nas sementes, além de protegê-las dos patógenos veiculados pelo solo, e das próprias sementes, quando as condições de semeadura são desfavoráveis.

O tratamento químico de sementes de soja tem se mostrado bastante eficiente, havendo uma série de produtos registrados para tal finalidade. Apesar da comprovada eficiência dos produtos químicos, a agricultura moderna tem buscado formas alternativas para o tratamento de sementes e o controle de doenças, de modo geral, que visem uma maior preservação ambiental. Nesse contexto, o emprego de substâncias naturais com ação fungicida surge como uma opção de baixo impacto ecológico e ambiental. Diversas espécies vegetais já mostraram efeito positivo no controle de doenças de plantas, sugerindo sua potencialidade também no tratamento de sementes.

Para ser uma prática viável, o emprego de substâncias naturais no tratamento de sementes, além de reduzir ou controlar a população microbiana das sementes, não pode ter efeito negativo sobre a fisiologia das sementes, prejudicando sua germinação ou seu vigor.

Diante do exposto, o objetivo da presente pesquisa é verificar a possibilidade de emprego de óleos essenciais de diferentes espécies vegetais no tratamento de sementes, visando o controle de *Phomopsis sojae*, e avaliar também o efeito destes produtos sobre a qualidade fisiológica das sementes tratadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A soja tem como centro de origem a região leste da China, onde foi domesticada por volta do século XI a.C. No Brasil, o primeiro registro da introdução da soja data de 1882, na Bahia. A utilização de soja para produção de grãos se deu em 1941, no Estado do Rio Grande do Sul, sendo, em seguida, introduzida no Paraná, por agricultores gaúchos. A partir da década de 70, a cultura da soja evoluiu significativamente nos estados produtores, não só no Sul, mas também nos Estados do Centro-Oeste do Brasil. Com o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas às diferentes regiões agroclimáticas do País, o Brasil tornou-se o segundo maior produtor mundial de soja (SOJA, 2013).

Estima-se que o Brasil será considerado, no ciclo 2013/2014, o maior produtor e exportador de soja em todo o mundo, ultrapassando os Estados Unidos. De acordo com a Informa Economics FNP, a previsão é de que a colheita supere 80 milhões de toneladas, ultrapassando, assim, o recorde anterior da safra de 2010/2011, quando o total colhido foi de 75 milhões de toneladas (O MUNDO, 2013). A estimativa de área de soja plantada em 2013/2014 está entre 28,7 milhões e 29,5 milhões de hectares, confirmando a tendência de aumento em todas as regiões produtoras do país, além de superar a safra de 2012/2013 onde foram semeados 27,7 milhões de hectares com soja. (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

Lavouras de diferentes culturas estão perdendo espaço para esta oleaginosa. Uma prova disto é a ocupação das áreas anteriormente destinadas apenas ao arroz irrigado no Rio Grande do Sul, por lavouras de soja. Outra situação semelhante ocorre no Mato Grosso, maior produtor de soja, onde a cultura já invadiu áreas de pastagens degradadas, além de tomar parte dos hectares destinados ao plantio de algodão. Outros estados, como Bahia e Paraná, também estão efetuando o encolhimento das áreas antes destinadas a outras culturas para a implantação de mais lavouras do cereal. As boas margens de lucro obtidas com a soja fazem com que outras culturas se tornem menos atraentes aos olhos dos produtores, sobretudo em relação às trocas de insumos (O MUNDO, 2013).

A soja no Brasil é predominantemente utilizada para o processamento do grão em óleo e proteína. A proteína processada (torta ou farelo) é utilizada como suplemento proteico na ração animal. Esse farelo é torrado/aquecido ao ponto de inativar os fatores antinutricionais naturalmente presentes na soja (inibidor de tripsina, estaquiose, rafinose, fitato). Os Estados Unidos e o Brasil são os maiores fornecedores de farelo de soja no mercado mundial. O óleo de soja é amplamente utilizado pela população brasileira, o qual contém apenas traços de proteína. Esse óleo é consumido diretamente ou em alimentos processados, como a margarina (SOJA, 2013).

2.1 Doenças na cultura da soja e transmissão de patógenos via sementes

A expansão da cultura da soja no território brasileiro acarretou num aumento de problemas para a produção de sementes de alta qualidade. Condições climáticas desfavoráveis, como chuvas e altas temperaturas durante as fases de maturação e colheita, podem afetar a qualidade fisiológica e a sanidade das sementes produzidas (HENNING, 2004).

As doenças são apontadas como um dos principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos de grãos de soja, afetando a produtividade da lavoura e causando prejuízos em relação à qualidade das sementes. Doenças de várias etiologias já foram identificadas no Brasil. Os problemas de ordem fitossanitária aumentaram com a expansão da soja para novas áreas, como consequência da monocultura e da introdução de novos patógenos. Embora as perdas anuais de produção em função de

doenças estejam estimadas em cerca de 15% a 20%, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (ALMEIDA et al., 2005).

A semente de soja tem um importante papel no estabelecimento da lavoura, além de ser o mais importante meio de disseminação e sobrevivência de muitos patógenos. Através das sementes, esses microrganismos são introduzidos em novas áreas, sobrevivem através dos anos e se disseminam pela população de plantas, como focos primários de doenças (GOULART, 1998).

As doenças fúngicas que afetam a soja merecem especial atenção, não somente devido ao maior número, mas pelos prejuízos causados no rendimento e na qualidade das sementes. Inúmeros microrganismos já foram identificados em sementes de soja, porém, poucos são considerados economicamente importantes (HENNING, 2004). Dentre os que se destacam, está o fungo *Phomopsis sojae* Lehman, causador da seca da haste e da vagem ou phomopsis da semente, com ocorrência em todo território brasileiro.

2.1.1 *Phomopsis sojae*

Entre os diversos fungos presentes em sementes de soja, muitos autores apontam *Phomopsis* spp. como o mais diretamente envolvido na redução da qualidade das sementes (ROSS, 1977; HENNING; FRANÇA NETO, 1980; BALDUCCHI; McGEE, 1987). O nível de danos depende das condições ambientais e sementes infectadas são a principal fonte de infecção primária em parcelas livres desta doença (BACKMAN, 1993).

Perdas na produção por *Phomopsis* spp. variam entre os anos agrícolas e entre regiões (WRATHER et al., 2001). Sinclair (1993) relatou que o fungo suprimiu a produção, reduziu a qualidade da semente usada para o plantio, por reduzir a germinação, e diminuiu a qualidade do grão usado no processamento. Já foi constatado que a qualidade do óleo derivado da semente infectada com *Phomopsis* spp. foi menor do que a de sementes sadias (HEPPERLY; SINCLAIR, 1978), mas os efeitos do fungo sobre a composição dos óleos da semente não foram determinados. Observações feitas anteriormente por Reis (1974) mostraram que as perdas causadas pela seca das hastes e das vagens estão intimamente relacionadas com períodos chuvosos prolongados, próximos à época da colheita, durante o verão.

Sementes e restos culturais constituem o inóculo primário no campo, sendo as primeiras um dos mais importantes veículos de disseminação do patógeno a longas distâncias. As sementes infectadas podem apresentar-se enrugadas, menores, com tegumento rompido e, geralmente, coberto por micélio de coloração branco-suja. As pouco afetadas podem não apresentar alterações visíveis, porém, ao germinarem, o tegumento mantém os cotilédones unidos, causando a morte das plântulas após a germinação e emergência. As sementes severamente infectadas não germinam e apodrecem no solo (BIZZETTO; HOMECHIN, 1997). França Neto e Henning (1992), no entanto, alertam para o fato de que sementes aparentemente sadias podem estar altamente infectadas por espécies de *Phomopsis* e/ou *Fusarium*.

De acordo com Henning e França Neto (1980), esporos e micélio de *P. sojae* podem permanecer aderidos ao tegumento das sementes. Este processo ocorre durante a colheita e trilha, no momento em que as sementes entram em contato com hastes contendo picnídios e outras estruturas do fungo, contaminando-as. Bizzetto e Homechin (1997) observaram que, durante os primeiros meses de armazenamento e para temperaturas de 18°C e 22°C, a retirada do tegumento reduziu significativamente a incidência do fungo *P. sojae* nas sementes. Zorrila et al. (1994) observaram que a presença de *Phomopsis longicolla* em sementes é mais acentuada sobre o tegumento e menos nos cotilédones. Segundo França Neto e West (1989), infecções sistêmicas são raras (média de 0,5%), apesar da existência de resultados contraditórios, demonstrados por Bolkhan et al. (1976), Kmetz et al. (1979) e Kunwar et al. (1985), os quais detectaram percentuais de incidência idênticos em tegumentos e tecido embrionário.

As vagens podem ser infectadas por *Phomopsis* spp. em qualquer fase após a sua formação, porém não ocorre infecção significativa antes da maturidade fisiológica das mesmas. A infecção tende a ser maior quando a colheita é mais tardia, em cultivares precoces ou quando a semeadura é feita em regiões em que as condições que antecedem a colheita são quentes e úmidas (SINCLAIR; BACKMAN, 1989).

Segundo Lucena et al. (1983) e Yorinori (1986) não há penetração pelo patógeno em tecidos intactos e, para que ocorra, são necessários ferimentos promovidos por insetos ou abrasão, rachaduras e outras injúrias. França Neto e Henning (1984) observaram que os maiores prejuízos e infecções por espécies de *Phomopsis* são decorrentes de atraso na colheita, especialmente quando há alternâncias de umidade e seca, que auxiliam na deterioração de vagens.

Os efeitos negativos de *Phomopsis* spp. sobre a germinação de sementes de soja são amplamente reconhecidos no laboratório, pelo método de rolo de papel toalha (HENNING; FRANÇA NETO, 1980) ou sobre meio de cultura (BISHT; SINCLAIR, 1985). Entretanto, resultados controversos têm sido publicados sobre a emergência de plântulas infectadas em areia ou solo. Paschal II e Ellis (1978) e McGee et al. (1980) relataram que a emergência de plântulas de soja foi negativamente relacionada com incidência de *Phomopsis* spp. Gleason e Ferris (1985) relataram tendência similar, mas adicionaram que perdas induzidas por *Phomopsis* spp. foram maiores em solo relativamente seco. Henning e França Neto (1980) e França Neto et al. (1985) observaram que *Phomopsis* spp. podem não afetar a emergência em solo ou areia se a qualidade fisiológica da semente for boa e as condições ambientais forem adequadas para rápida emergência. Kulik e Schoen (1981) também reportaram que a infecção da semente pode ou não afetar a qualidade e a performance no campo de lotes de sementes, dependendo do local de produção.

A aplicação de fungicidas foliares é utilizada visando aumento da produção e melhoria na qualidade de sementes, principalmente por meio do controle de *Phomopsis* spp., *C. dematium* var. *truncata*, *Cercospora sojina*, *C. kikuchii*. Sinclair & Backman (1989), observaram que, geralmente, fungicidas aplicados entre os estádios de desenvolvimento R2 e R5 levam aos melhores resultados, em termos de produção e qualidade sanitária de sementes. Já aplicações de fungicidas em R6 ou posteriormente levam a pouco ou nenhum ganho em termos de produção, mas conduz a um aumento significativo na redução da infecção de sementes por *C. dematium* var. *truncata*, *C. kikuchii* e *Phomopsis* spp.

2.2 Tratamento de sementes

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

O tratamento de sementes pode ser entendido, de maneira genérica, como qualquer operação que envolva as sementes, seja pelo manejo através da incorporação de produtos químicos ou biológicos à sua superfície ou interior, seja pela utilização de agentes físicos, visando à melhoria ou garantia do seu desempenho em condições de cultivo. Especificamente para o controle de patógenos, o tratamento de sementes pode ser praticado, utilizando-se métodos químicos, físicos, biológicos ou a combinação destes (ZAMBOLIM, 2004). Esta prática tem baixo custo e seu efeito sobre o ambiente é bastante restrito quando comparada a outras técnicas de aplicação de produtos químicos (MORAES, 2004).

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

O tratamento de sementes com fungicidas vem sendo cada vez mais utilizado pelos sojicultores, que reconhecem os benefícios de uma semente tratada. Segundo levantamento relativamente recente, o tratamento de sementes com fungicidas no Brasil alcança mais de 90% para as culturas de soja, milho, algodão e trigo. O tratamento industrial de sementes, comum para a cultura do milho há décadas, é prática recente para as sementes de soja; em 2011, apenas aproximadamente 20% das sementes de soja foram tratadas na unidade de beneficiamento de sementes, mas a tendência é de um aumento neste percentual, em função do investimento de empresas em equipamentos para o tratamento das sementes (PESKE, 2012).

2.3 Produtos naturais no manejo de doenças de plantas

A agricultura moderna tem aumentado tanto sua potencialidade de produção quanto a aplicação de produtos tóxicos, para o controle de pragas e doenças de plantas. O uso indiscriminado de fungicidas tem causado danos não só ao meio ambiente, mas aos seres vivos, e tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos a estas substâncias químicas (GUINI; KIMATI, 2000). Novas medidas de proteção de plantas

contra doenças têm sido pesquisadas, no intuito de minimizar os efeitos negativos do uso de produtos químicos e aumentar a produção de alimentos de melhor qualidade, propiciando, assim, o desenvolvimento de uma agricultura alternativa e/ou sustentável (POPIA et al., 2007). Neste contexto, insere-se o controle alternativo de doenças de plantas, que inclui o controle biológico, a indução de resistência e o uso de produtos naturais com atividade indutora de resistência e/ou com atividade antimicrobiana direta (SCHAWN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

A utilização de produtos naturais na agricultura tem suas vantagens (DEFFUNE, 2001), principalmente em função da baixa toxidez e da rápida degradação (SAITO; LUCHINI, 1998; GHINI; KIMATI, 2000), o que diminui os problemas de intoxicação de pessoas e o acúmulo de resíduos no solo. Biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais têm sido relatados como potentes fungicidas e inseticidas naturais, onde os resultados alcançados nessa linha de pesquisa têm-se mostrado promissores para a utilização prática no controle de diversos fitopatógenos (FRANCO; BETTIOL, 2000; BENATO et al., 2002; SANTOS et al., 2004; BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004)

Stangarlin e Schawn-Strada (2008) fizeram um levantamento, no período de 1998 a 2007, de artigos publicados em periódicos nacionais especializados em fitopatologia e de resumos apresentados nos congressos paulista e brasileiro de fitopatologia e verificaram um aumento na quantidade de pesquisas envolvendo o uso de extratos de origem vegetal para o controle de doenças de plantas. De acordo com este levantamento, constatou-se que, a partir de 2003, houve um aumento considerável de trabalhos com emprego de extratos vegetais, chegando a atingir 6% dos artigos publicados em 2007. Com relação aos resumos apresentados em congressos, a evolução foi mais rápida, aumentando de 2% de trabalhos em 1998 para 10%, em 2007. Os extratos utilizados nesses trabalhos têm sido obtidos principalmente de espécies vegetais arbóreas, como nim e eucalipto, e de espécies herbáceas medicinais, como alho, citronela, menta, arruda, alecrim, mil-folhas, gengibre, manjerição, cânfora e alfavaca.

Diversos compostos são provenientes do metabolismo secundário de algumas plantas, podendo ser utilizados no controle de fitopatógenos. Um exemplo disto são os óleos essenciais, considerados misturas complexas de substâncias voláteis, com baixa massa molecular, líquidas, lipofílicas e odoríferas em sua maior parte. São extraídos das partes vegetais através de arraste a vapor d'água, expressão de pericarpo ou

hidrodestilação. Possuem característica volátil e aspecto oleoso em temperatura ambiente (MORAIS, 2009).

Os óleos essenciais possuem grande potencial para controle de fungos e bactérias fitopatogênicos. Podem agir diretamente sobre os fungos, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Há relatos de que os óleos essenciais, em contato com microrganismos, interferem na permeabilidade das células, causando a vazão de seus constituintes (PIPER et al., 2001). Experimentos realizados com óleo de “tea tree” (*Melaleuca alternifolia*) demonstraram danos à membrana de *Candida albicans* e efeito na permeabilidade da membrana celular das leveduras (BARD et al., 1988; COX et al., 2000).

O nim (*Azadirachta indica*), árvore originária da Índia, onde é tradicionalmente utilizado como remédio, traz grandes benefícios para a agricultura e a pecuária. Seus produtos são usados na proteção natural de plantas e animais domésticos contra um grande número de pragas e doenças. Controla lagartas, besouros, gafanhotos, pulgões, cochonilhas, mosca branca e pragas de grãos armazenados. É também indicado no controle de nematóides e doenças provocadas por fungos e bactérias. Muitos compostos ativos já foram isolados da árvore, sendo que a azadiractina, encontrada principalmente nas sementes, é considerada o composto mais potente. A atividade biológica do óleo extraído das sementes e de extratos de folhas e de sementes tem sido demonstrada (MARTINEZ, 2002) e os resultados das pesquisas sobre a eficácia do nim no controle de insetos, bactérias, fungos e nematóides têm sido promissores (KOUL et al., 1990; AMADIOHA, 2000; KISHORE et al., 2001; CARNEIRO, 2002; 2003). Carneiro et al. (2008) testaram a aplicação de extrato de sementes e de óleo de nim em plantas de feijoeiro e constataram efeito positivo sobre o controle da mancha angular.

Souza et al. (2012) avaliaram o efeito dos óleos essenciais de nim (*Azadirachta indica*), coco (*Cocos nucifera*), eucalipto (*Eucaliptus* spp.), copaíba (*Copaifera* sp.), andiroba (*Carapa guianensis*), hortelã (*Mentha* sp.), babaçu (*Orbignya phalerata*), semente de uva (*Vitis vinifera* L.), amêndoa (*Prunus amygdalus*) e pau rosa (*Aniba rosaeodora*) sobre o desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloesporioides* em frutos de pimenta-de-cheiro pós-colheita e *in vitro*. Estes autores observaram que, *in vitro*, os óleos inibiram o crescimento fúngico, exceto os óleos de babaçu, semente de uva e amêndoa; em pós-colheita, somente o óleo de babaçu não foi eficiente na redução das lesões de antracnose.

A planta medicinal eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) possui, na sua composição química, compostos químicos do metabolismo secundário, como citrionelol, geraniol, isopulegol, a e b pineno, cineol, guaíol, estragol, g-elemento, nopinemo, canfeno, mirceno e b-cimeno, que possuem propriedades antimicrobianas e/ou elicitoras e podem contribuir para o controle natural de doenças de plantas (STANGARLIN et al., 1999). Bonaldo et al. (2004) constataram o potencial de *Eucalyptus citriodora* no controle alternativo de antracnose em pepino, observando inibição na germinação de esporos e na formação de apressórios de *Colletotrichum lagenarium* com o emprego de extrato aquoso desta essência florestal. Marques et al. (2008) também observaram a ação inibitória de extrato de eucalipto sobre o crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, *Bipolaris sorokiniana* e *B. oryzae*. Ootani (2010), avaliando as atividades inseticidas, antifúngicas e herbicidas dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon nardus in vitro*, concluiu que a atividade antifúngica destes óleos é consideravelmente eficaz sobre *Aspergillus* sp., *Pyricularia grisea* e *Colletotrichum musae*, impedindo o desenvolvimento micelial destes. Com o objetivo de avaliar o emprego do extrato aquoso de *E. citriodora* no controle de antracnose em pepino e cretamento bacteriano do feijão, Franzener et al. (2011) verificaram que, aplicando o extrato antes que o patógeno fosse inoculado, houve redução da severidade e indução da atividade de peroxidase, em ambas as culturas, sugerindo um possível efeito indutor de resistência

O extrato obtido de alho (*Allium sativum* L.) é um dos mais pesquisados, tendo apresentado efeito inibitório para extensa gama de fungos, envolvendo patógenos de pós-colheita, patógenos foliares e habitantes do solo (TANSEY; APPLETON, 1975; CHALFOUN; CARVALHO, 1987; BOLKHAN; RIBEIRO, 1981; BASTOS, 1992; BARROS et al., 1995). Ribeiro e Bedendo (1999) demonstraram o efeito inibitório de extrato aquoso de alho sobre o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, em meio de cultura, porém não houve efeito significativo sobre a esporulação. Souza et al. (2007) estudaram o efeito de extratos de alho e de capim santo no crescimento e produção de esporos de *Fusarium proliferatum* isolado de milho, constatando redução na taxa de crescimento micelial e na esporulação deste fungo. Santos et al. (2010) também demonstraram efeito inibitório do extrato de alho sobre o crescimento de *Aspergillus niger* isolado de plantas de sisal.

O efeito de óleos essenciais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), capim citronela (*Cymbopogon winterianus*), hortelã-japonesa (*Mentha arvensis*

L.) e alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) foi testado *in vitro* sobre o crescimento micelial e esporulação do fungo *Lasiodiplodia theobromae* e *in vivo* sobre o crescimento das lesões foliares, apicais e do colo em mudas de gravioleira infetadas, por Souza (2001). Os óleos essenciais foram eficientes em inibir, *in vitro*, a esporulação do fungo, tendo o óleo de alecrim apresentado o melhor efeito também no crescimento deste fungo. Nos testes *in vivo*, os resultados mostraram que a utilização preventiva dos óleos essenciais de alecrim pimenta, alfavaca-cravo e hortelã-japonesa podem ser uma alternativa para o controle da podridão-seca da gravioleira. Também foi observada a ausência de sintomas de fitotoxicidade nas mudas de gravioleiras, quando testadas em quaisquer tratamentos ou concentrações. Souza et al. (2006) observaram 100% de inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani* com a utilização de óleo essencial de citronela. Pereira et al. (2012) investigaram a ação do óleo essencial de citronela sobre os fungos *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola* e na ativação de resposta de defesa do cafeeiro, e observaram uma eficácia de controle de 47,2% da ferrugem e de 29,7% da cercosporiose; além disso, o óleo promoveu um aumento da atividade de quitinase e peroxidase nas mudas de cafeeiro.

A ação de extratos de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) sobre fungos fitopatogênicos do arroz foi testada *in vitro*. Os resultados mostraram que existe certo efeito do extrato etanólico obtido de folhas secas de manjerição para os fungos *Gerlachia oryzae* e *Alternaria* sp. e que o efeito deste parece não obedecer a uma relação crescente com a dosagem (ZANANDREA et al., 2003). Testando óleos de diferentes espécies botânicas visando o controle de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora* sp. e *Colletotrichum graminicola*, Stangarlin et al. (1999) constataram que o óleo de manjerição inibiu totalmente o crescimento destes fungos. O efeito inibitório do óleo essencial de citronela foi observado sobre o desenvolvimento *in vitro* da bactéria *Erwinia carotovora*, isolada de alface e repolho (COSTA et al., 2008).

O orégano (*Origanum vulgare* L.) é utilizado como condimento e medicinalmente, sendo-lhe atribuídas diversas indicações, tais como, efeitos antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, antioxidante, anticancerígeno, emoliente e digestivo (LORENZI; MATOS, 2002). Todas essas características são atribuídas ao carvacrol, composto químico considerado principal pela sua abundância. Zanandrea et al. (2004) testaram o efeito do óleo essencial de orégano sobre o crescimento micelial de fungos patogênicos ao arroz, como *Alternaria* sp., *Bipolaris oryzae*, *Curvularia* sp.,

Gerlachia oryzae, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, constatando efeito inibitório sobre o crescimento de todos os fungos.

Diversos trabalhos similares, especialmente envolvendo a investigação do efeito de produtos naturais sobre fungos fitopatogênicos *in vitro*, têm sido conduzidos com várias espécies vegetais, como *Cymbopogon citratus*, *Mentha arvensis*, *Artemisia dracunculus*, *Ruta graveolens*, *Zingiber officinale*, *Catharanthus roseus*, *Artemisia absinthium*, *Nicotiana tabacum*, *Curcuma longa*, *Solidago chilensis*, *Cymbopogon martinii*, *Costus pisonis*, *Achillea millefolium*, *Pelcctranthus barbatus*, *Artemisia camphorata* e *Rosmarinus officinalis*, entre outras. A ação do extrato e/ou óleo dessas espécies é testada sobre diversas espécies fúngicas, tendo um maior número de trabalhos desenvolvidos com fungos do gênero *Colletotrichum*. Em geral, os resultados demonstraram efeito satisfatório de controle dos patógenos *in vitro* (CARVALHO et al., 2008; DINIZ et al., 2008; SILVA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; CARNELOSSI et al., 2009; SCAPIN et al., 2010)

O tratamento de semente é uma prática recomendada para a instalação de lavouras bem sucedidas, havendo um considerável número de produtos químicos disponibilizados para a sua realização. Para o tratamento de sementes e mais diretamente com relação aos patógenos transmitidos por essa via, o emprego de produtos naturais extraídos da flora nativa pode constituir-se numa alternativa para melhorar a qualidade das sementes, pois, segundo estudos realizados com o uso de extratos (KHAN, 1989; SHETTY et al., 1989; KUMAR, 1990; MAGALHÃES, 1996; COUTINHO et al., 1999) e óleos essenciais (MISHRA, (1990), citado por SOUZA et al., 2003; MAGALHÃES, 1996), estes foram efetivos no controle de patógenos.

Belém (1997) observou que o óleo essencial e o extrato etanólico de cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) inibiram de forma eficiente a germinação de conídios e o crescimento micelial dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp., importantes fungos que incidem em sementes.

O extrato obtido da entrecasca da aroeira (*Astronium urundeuva* L.), no Estado da Paraíba, foi usado no tratamento de sementes de feijão comum - *Phaseolus vulgaris* L. (COUTINHO et al., 1999), feijão macassar - *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (MAGALHÃES, 1996) e pimentão - *Capsicum anuum* L. (MACEDO, 1997), tendo sido verificado o controle total ou parcial de alguns fungos. Por outro lado, Souza et al. (2003) verificaram que o extrato de aroeira puro não controlou fungos em sementes de

algodoeiro, porém, quando associado aos fungicidas, captan, benomyl e tolylfluanid, reduziu a incidência de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* sp. em uma cultivar avaliada; houve redução na viabilidade e no vigor das sementes deslintadas tratadas com o extrato de aroeira puro ou associado aos fungicidas.

Em sementes de feijoeiro tratadas com extrato de cravo da Índia a 10%, não foi observado o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. e *Macrophomina phaseolina*, porém, nesta concentração, o produto reduziu o índice de velocidade de germinação das sementes (GONÇALVES et al., 2003).

Souza et al. (2007) verificaram que o tratamento de sementes de milho com extratos de alho e capim santo reduziu a incidência de *Fusarium moniliforme*.

Medeiros et al. (2007) utilizaram pó de folhas secas e verdes de nim para o tratamento de sementes de feijão caupi e verificaram que estes não apresentaram efeito tóxico para as sementes de caupi em relação à primeira contagem de plântulas e porcentagem de germinação, exceto para matéria seca das plântulas. O aumento de dosagens dos pós de folhas secas e verdes de nim não ocasionou efeito prejudicial às sementes de caupi para todas as características fisiológicas estudadas. Embora estes autores não tenham estudado o efeito do tratamento das sementes sobre a incidência de patógenos, conhecendo-se a ação do nim sobre estes, os resultados dessa pesquisa são um indicativo do potencial de uso do nim no tratamento de sementes.

Em função dos benefícios proporcionados pelo uso de produtos naturais com ação fungicida no tratamento de sementes, tanto em termos de controle de patógenos, como de preservação ambiental, é justificada a investigação do efeito da aplicação destes produtos, em tratamento de sementes, para se comprovar que não há interferência negativa no potencial fisiológico das mesmas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido junto aos Departamentos de Proteção Vegetal e de Produção e Melhoramento Vegetal, da FCA/UNESP, Câmpus de Botucatu, SP, de setembro de 2012 a outubro de 2013, e constou de duas etapas: a avaliação do efeito *in vitro* dos óleos vegetais sobre *Phomopsis sojae* e a avaliação do efeito destes produtos no tratamento de sementes para controle deste fungo e sobre a qualidade fisiológica das sementes.

3.1 Efeito *in vitro* de óleos essenciais no desenvolvimento de *Phomopsis sojae*

Para a avaliação do efeito dos óleos essenciais no desenvolvimento de *P. sojae*, foi conduzido um experimento *in vitro*, avaliando-se o crescimento micelial e a esporulação deste fungo cultivado em meio de cultura acrescido dos óleos. Para tanto, foram empregados óleos essenciais das seguintes espécies vegetais: *Azadirachta indica* (nim), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Cymbopogon nardus* (citronela), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Eucalyptus citriodora* (eucalipto citriodora), *Eugenia caryophyllus* (cravo), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Ocimum basilicum* (manjerição), que foram adicionados ao meio de cultura em quatro concentrações: 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%. Os

óleos utilizados foram adquiridos junto à Empresa Terra Flor Aromaterapia, exceto o óleo de nim, da empresa Natural Rural.

O isolado de *P. sojae*, proveniente da coleção da Profa. Rita de Cássia Panizzi, da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Após cerca de sete dias de incubação a 22 °C e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente, discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados da periferia da colônia fúngica e transferidos para placas de Petri contendo os tratamentos.

Os óleos essenciais foram adicionados ao meio de cultura BDA no momento deste ser vertido em placas de Petri, nas concentrações previamente descritas. Dois tratamentos testemunha foram incluídos no trabalho: meio BDA puro e meio BDA acrescido de fungicida à base de tiofanato metílico + fluazinam (1000 ppm). Após a solidificação do meio, discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados das colônias fúngicas e transferidos para as placas de Petri contendo os tratamentos. As placas foram mantidas em câmaras tipo BOD, a 22 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

O experimento, realizado em duplicata (Ensaio 1 e Ensaio 2), foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, segundo o esquema fatorial 8 x 4 (8 espécies vegetais x 4 concentrações) e duas testemunhas, com 3 repetições, sendo cada placa uma repetição.

O crescimento micelial foi acompanhado diariamente e avaliado até a primeira colônia fúngica atingir as bordas da placa de Petri (representando o crescimento máximo), medindo-se o diâmetro das colônias (cm), em todos os tratamentos, em duas posições perpendiculares entre si, considerando-se o valor médio dessas medidas. Os resultados da última avaliação foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias das testemunhas e do fatorial, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cada testemunha foi comparada aos demais tratamentos pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade (BANZATTO; KRONKA, 2006).

Para a avaliação da esporulação, foram retirados discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro, em três posições do raio de crescimento da colônia fúngica, e transferidos para recipientes plásticos contendo 5 mL de água destilada com espalhante adesivo Tween 80 (uma gota em 100 mL de água). Estes recipientes foram agitados durante três minutos, obtendo-se, assim, a suspensão de conídios para a leitura da esporulação. A concentração de conídios foi determinada através de leitura em

hemocítômetro. Foram realizadas quatro leituras por repetição, considerando-se o valor médio destas. Como a esporulação só pôde ser avaliada nos tratamentos em que houve crescimento micelial, os dados foram submetidos à análise estatística considerando-se o delineamento inteiramente casualizado, sem composição em fatorial. Para a análise estatística, os resultados foram transformados para log x e submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (BANZATTO; KRONKA, 2006).

3.2 Efeito do tratamento de sementes com óleos essenciais sobre a incidência de *Phomopsis sojae* e o potencial fisiológico das sementes

Com base nos resultados dos ensaios *in vitro*, os óleos de capim-limão, cravo e manjerição foram selecionados para dar continuidade ao trabalho, sendo empregados no tratamento de sementes. Esses óleos foram os que apresentaram resultados mais consistentes nos dois ensaios *in vitro*, em todas as concentrações testadas.

3.2.1 Obtenção de sementes infectadas com *Phomopsis sojae*

O isolado do fungo *Phomopsis sojae* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA para produção de inóculo visando à infecção das sementes. Após sete dias de incubação a 22°C e fotoperíodo de 12 horas, discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados da periferia da colônia fúngica e transferidos para placas de Petri contendo BDA acrescido de manitol, no potencial hídrico de -1,0 MPa (BDA acrescido de 73,77g de manitol; água – q.s.p. 1000 mL). A concentração do soluto (manitol) é obtida pela fórmula de Van't Hoff (SALISBURY; ROSS, 1991):

$$P_o = -iC_iRT$$

Onde:

P_o = Potencial osmótico (MPa);

i = Constante de ionização;

R = Constante geral de gases ($0,00831 \times \text{Kg} \times \text{MPa} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$);

T = Temperatura absoluta ($T\text{ }^{\circ}\text{C} + 273$);

C = Concentração (moles Kg^{-1} de água).

Sementes da cultivar BMX Potência RR (safra 2012/2013, armazenadas em câmara fria) foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2 % por um minuto, e secas sobre folhas de papel de filtro esterilizadas, em condições ambiente. Parte das sementes foi depositada, em camada única, nas placas contendo o inóculo em meio osmoticamente modificado anteriormente descrito, permanecendo em contato com o patógeno por 24 horas. A outra parte das sementes foi submetida às mesmas condições, porém sem a presença do inóculo no meio. Em seguida, as sementes foram misturadas, de modo a se obter um lote de trabalho com 20% de infecção.

3.2.2 Tratamento das sementes

Para o tratamento das sementes com os óleos essenciais, estes foram misturados em água destilada esterilizada, contendo Tween 80 (1,0 mL/L). Foram adotadas as duas concentrações menores empregadas no experimento *in vitro*: 0,25% e 0,50%. As sementes foram imersas na solução por cinco minutos e, em seguida, dispostas sobre papel toalha para secar. Foram incluídos dois tratamentos testemunha: um composto por sementes inoculadas e outro, por sementes não inoculadas, ambos imersos apenas em água destilada + Tween 80, pelo mesmo período anteriormente descrito.

Após o tratamento das sementes, estas foram avaliadas quanto à sanidade e ao potencial fisiológico, conforme os procedimentos descritos a seguir.

3.2.2.1 Avaliação da sanidade das sementes

O efeito dos tratamentos sobre a incidência de patógenos nas sementes foi avaliado pelo método do papel de filtro (BRASIL, 2009), que consistiu em colocar três discos de papel de filtro previamente umedecidos em água destilada, em placas de Petri de plástico (diâmetro de 9,0 cm). Em cada placa, foram distribuídas sobre o substrato (papel de filtro), dez sementes equidistantes, utilizando-se dez repetições de dez sementes/tratamento, totalizando, portanto, uma amostra de trabalho com 100 sementes/tratamento. As sementes foram incubadas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas sob luz branca fluorescente, e examinadas, individualmente, sob microscópio estereoscópico, para a detecção do fungo, após sete dias de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com *P. sojae*.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com oito tratamentos e dez repetições, sendo a parcela experimental constituída por uma placa de Petri com dez sementes de soja. Os dados, transformados em $\arcsin \sqrt{x}$, foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (BANZATTO; KRONKA, 2006).

3.2.2.2 Avaliação do potencial fisiológico das sementes

O efeito do tratamento das sementes com os óleos essenciais sobre o potencial fisiológico destas foi avaliado através dos testes de germinação em rolo de papel toalha, primeira contagem de germinação e comprimento de plântulas em rolo de papel, conforme descrito a seguir.

A) Germinação. O teste foi realizado de acordo com a técnica do rolo de papel (RP), tendo-se o papel de germinação como substrato. Foram empregadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. O papel de germinação foi pré-umedecido com quantidade de água desionizada equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas e sobrepostas com uma terceira folha, embrulhadas em forma de rolo. Os rolos foram mantidos, no germinador, na posição vertical, a 25 °C. As avaliações foram realizadas aos cinco (primeira contagem de germinação) e aos oito dias após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais para cada tratamento (BRASIL, 2009).

B) Primeira contagem da germinação. Este teste de vigor foi realizado concomitante ao teste de germinação, através da primeira contagem de germinação, realizada aos cinco dias do referido teste, avaliando-se a porcentagem de plântulas normais (NAKAGAWA, 1999).

C) Comprimento de plântulas. Do teste de germinação em rolo de papel, na primeira avaliação (5º dia), foram retiradas dez plântulas ao acaso. As avaliações foram realizadas através da medição do comprimento da radícula e hipocótilo, que somados deram o comprimento total das plântulas. Os resultados foram expressos em centímetros.

Além destes testes de laboratório, foi conduzido um experimento em casa de vegetação, onde foram avaliados o índice de velocidade de emergência (IVE),

a germinação, o comprimento e a massa seca de plântulas, de acordo com os seguintes procedimentos:

A) Índice de Velocidade de Emergência (IVE). Foi obtido a partir do teste de germinação em areia, por meio de contagens diárias de plântulas normais, até a estabilização da emergência. Com base no número de plântulas emergidas, foi calculado o IVE, empregando-se a seguinte fórmula (MAGUIRE, 1962):

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

Onde:

$N_1, N_2, \dots, N_n = n^\circ$ de dias decorridos da semeadura até a primeira, segunda, ..., última contagem.

$E_1, E_2, \dots, E_n = n^\circ$ de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem.

B) Emergência em areia: o teste foi conduzido conforme prescrito em BRASIL (2009), com quatro repetições de 50 sementes por tratamento. Foi computado o número de plântulas normais emergidas aos 13 dias após a semeadura, quando se fez a última leitura do IVE, sendo os resultados expressos em porcentagem.

C) Comprimento e massa seca de plântulas: ao final do teste de germinação, foi medida a altura da parte aérea e do sistema radicular de cinco plantas/parcela, retiradas ao acaso, sendo os valores somados e expressos em centímetros na forma de valores médios de altura de plântulas. Em seguida, as plântulas foram acondicionadas em sacos de papel em estufa de circulação de ar, regulada à temperatura de 70°C, na qual permaneceram até atingirem peso constante. Então, foi determinada a matéria seca/parcela, em balança analítica (precisão 0,001g), sendo o resultado expresso em gramas.

O delineamento experimental empregado nos ensaios de potencial fisiológico das sementes foi o inteiramente casualizado, com as repetições especificadas em cada teste, conforme descrito anteriormente. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (BANZATTO; KRONKA, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito *in vitro* de óleos essenciais no desenvolvimento de *Phomopsis sojae*

No primeiro experimento (Tabela 1), os tratamentos utilizados como padrões para comparação para a eficiência dos óleos (BDA puro - referido apenas como testemunha - e BDA + fungicida) diferiram entre si, com 100% de crescimento micelial nas placas somente com meio de cultura e 100% de inibição pelo fungicida. Todos os tratamentos testados diferiram da testemunha, exceto o óleo de gengibre aplicado na concentração de 0,25%. Os óleos de capim-limão, citronela, eucalipto citriodora, cravo e manjerição inibiram em 100% o crescimento fúngico, em todas as concentrações, sempre diferindo significativamente dos óleos que permitiram algum crescimento micelial. Dentre esses tratamentos que possibilitaram o desenvolvimento do fungo, observou-se, na concentração 0,25%, crescimento micelial médio de 4,3 e 3,7 cm, para os óleos de alecrim e de nim, respectivamente (49,80% e 57,06% de porcentagem de inibição do crescimento, respectivamente), que diferiram significativamente do óleo de gengibre, o qual apresentou o maior crescimento micelial, com 7,5 cm de diâmetro (inibição de apenas 11,77% do crescimento). Na concentração de 0,50%, os óleos de nim e alecrim diferiram significativamente entre si, apresentando diâmetros médios de 2,9 e 5,2 cm,

respectivamente, sendo o óleo de gengibre intermediário a estes, com 4,4 cm de crescimento, não diferindo de ambos. Nas concentrações de 0,75% e 1,0% além dos óleos de capim-limão, citronela, eucalipto citriodora, cravo e manjerição, o óleo de alecrim também resultou em 100% de inibição de crescimento micelial. Nestas concentrações, o óleo de gengibre resultou em crescimento micelial significativamente superior aos demais tratamentos, demonstrando não possuir, nestas condições, efeito inibidor sobre o desenvolvimento deste fungo. O óleo de nim possibilitou o crescimento nestas concentrações, porém, quando aplicado a 1,0%, não diferiu dos tratamentos que resultaram em 100% de inibição de crescimento micelial. Neste experimento, quando comparados os resultados de crescimento micelial dos tratamentos à base de óleo com o fungicida, verificou-se que o gengibre diferiu do fungicida em todas as concentrações, o alecrim, nas concentrações 0,25% e 0,50%, e o nim, apenas na concentração mais baixa (0,25%). Quando se compara as concentrações dentro de cada óleo, verifica-se que só há diferença significativa entre estas para os óleos que permitiram algum crescimento micelial (nim, alecrim e gengibre), sendo os piores resultados de inibição obtidos na concentração mais baixa, como já era esperado.

No segundo experimento (Tabela 1), o comportamento dos tratamentos de comparação foi o mesmo do primeiro experimento. Apenas os óleos de alecrim e eucalipto citriodora, nas concentrações 0,25% e 0,50%, e o de gengibre, em todas as concentrações, não diferiram da testemunha padrão; estes tratamentos diferiram do fungicida. Para todos os demais tratamentos, observou-se o inverso, ou seja, eles não diferiram do fungicida e diferiram da testemunha padrão. Como havia sido observado no primeiro experimento, os óleos de capim-limão, cravo e manjerição resultaram em 100% de inibição do crescimento micelial em todas as concentrações. Neste caso, no entanto, os óleos de citronela e eucalipto citriodora, que também haviam apresentado 100% de eficiência inibitória no primeiro experimento, permitiram o desenvolvimento do fungo nas concentrações 0,25% (ambos) e 0,50% (eucalipto). Nas concentrações 0,25% e 0,50%, os óleos de alecrim, eucalipto e gengibre não diferiram entre si, nem da testemunha padrão, diferiram do fungicida e resultaram em diâmetros médios superiores aos demais tratamentos. Para as duas concentrações maiores (0,50% e 0,75%), não se verificou diferença no desenvolvimento fúngico dos tratamentos, exceto para o óleo de gengibre, que apresentou alto crescimento micelial (6,8 cm e 7,6 cm, para 0,50% e 0,75%, respectivamente), não diferindo da testemunha padrão, que havia atingido o crescimento

máximo nas placas. Analisando-se dentro de cada óleo, verificou-se diferença significativa entre as concentrações apenas para os óleos de alecrim e eucalipto, sendo que, em ambos, as concentrações 0,50% e 0,75% foram mais eficientes em inibir o crescimento micelial, diferindo da testemunha padrão, sem diferir do fungicida.

Tabela 1. Efeito de óleos essenciais e do fungicida tiofanato metílico + fluazinam no crescimento micelial *in vitro* e porcentagem de inibição de crescimento (PIC) de *Phomopsis sojae*. Botucatu, SP, 2014.

Tratamentos		Experimento 1		Experimento 2	
		Crescimento micelial (cm)	PIC (%)	Crescimento micelial (cm)	PIC (%)
Nim	0,25%	3,7 b A ^{1,2}	57,06	0,5 b A ¹	93,73
	0,50%	2,9 b AB ¹	65,88	0,8 b A ¹	90,00
	0,75%	2,7 b AB ¹	68,24	0,4 b A ¹	95,88
	1,00%	1,5 b B ¹	82,16	0,3 b A ¹	96,47
Capim-limão	0,25%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	0,50%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	0,75%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	1,00%	0,0 b A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
Citronela	0,25%	0,0 c A ¹	100,00	1,6 b A ¹	81,57
	0,50%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	0,75%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	1,00%	0,0 b A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
Alecrim	0,25%	4,3 b A ^{1,2}	49,80	8,5 a A ²	0,00
	0,50%	5,2 a A ^{1,2}	38,63	8,2 a A ²	3,93
	0,75%	0,0 c B ¹	100,00	2,8 b B ¹	92,94
	1,00%	0,0 b B ¹	100,00	0,6 b B ¹	66,67
Eucalipto citriodora	0,25%	0,0 c A ¹	100,00	8,3 a A ²	1,96
	0,50%	0,0 c A ¹	100,00	4,8 a B ²	43,17
	0,75%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b C ¹	100,00
	1,00%	0,0 b A ¹	100,00	0,0 b C ¹	100,00
Cravo	0,25%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	0,50%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	0,75%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	1,00%	0,0 b A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
Gengibre	0,25%	7,5 a A ²	11,77	8,5 a A ²	0,00
	0,50%	4,4 ab B ^{1,2}	47,84	5,7 a A ²	33,33
	0,75%	5,0 c B ^{1,2}	40,98	6,8 a A ²	20,20
	1,00%	4,3 a B ^{1,2}	49,02	7,6 a A ²	10,59
Manjeriço	0,25%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	0,50%	0,0 c A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	0,75%	0,0 a A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
	1,00%	0,0 b A ¹	100,00	0,0 b A ¹	100,00
BDA (testemunha)		8,5*		8,5*	
Fungicida (1000 ppm)		0,0*		0,0*	

Em cada coluna de crescimento micelial:

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

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

*as médias das testemunhas diferem entre si, pelo teste F ($P<0,01$)

¹ médias diferem da testemunha (BDA), pelo teste de Dunnett ($P<0,05$)

² médias diferem do fungicida, pelo teste de Dunnett ($P<0,05$)

A segunda variável adotada para avaliar a eficiência dos óleos em inibir o desenvolvimento fúngico *in vitro* foi a esporulação. Esta só pôde ser determinada nos tratamentos que possibilitaram algum crescimento micelial (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de óleos essenciais na esporulação *in vitro* de *Phomopsis sojae*. Botucatu, SP, 2014.

Tratamentos		Experimento 1		Experimento 2	
		Esporulação		Esporulação	
		Log x	Nº esporos/mL	Log x	Nº esporos/mL
Nim	0,25%	10,40 a	3,42 x 10 ⁴	11,05 a	125,33 x 10 ⁹
	0,50%	10,42 a	3,50 x 10 ⁴	11,34 a	252,50 x 10 ⁹
	0,75%	10,29 a	3,00 x 10 ⁴	11,35 a	222,33 x 10 ⁹
	1,00%	10,48 a	3,75 x 10 ⁴	11,38 a	252,83 x 10 ⁹
Capim-limão	0,25%	-	-	-	-
	0,50%	-	-	-	-
	0,75%	-	-	-	-
	1,00%	-	-	-	-
Citronela	0,25%	-	-	-	-
	0,50%	-	-	-	-
	0,75%	-	-	-	-
	1,00%	-	-	-	-
Alecrim	0,25%	10,37 a	3,42 x 10 ⁴	5,88 b	78,92 x 10 ⁴
	0,50%	9,93 a	2,08 x 10 ⁴	5,93 b	93,33 x 10 ⁴
	0,75%	-	-	-	-
	1,00%	-	-	-	-
Eucalipto citriodora	0,25%	-	-	5,74 bc	61,92 x 10 ⁴
	0,50%	-	-	5,49 bcd	27,67 x 10 ⁴
	0,75%	-	-	-	-
	1,00%	-	-	-	-
Cravo	0,25%	-	-	-	-
	0,50%	-	-	-	-
	0,75%	-	-	-	-
	1,00%	-	-	-	-
Gengibre	0,25%	10,35 a	3,33 x 10 ⁴	5,28 cd	19,58 x 10 ⁴
	0,50%	10,18 a	2,75 x 10 ⁴	5,13 d	14,67 x 10 ⁴
	0,75%	10,70 a	4,50 x 10 ⁴	5,04 d	11,17 x 10 ⁴
	1,00%	10,52 a	4,42 x 10 ⁴	5,16 d	14,50 x 10 ⁴
Manjerição	0,25%	-	-	-	-
	0,50%	-	-	-	-
	0,75%	-	-	-	-
	1,00%	-	-	-	-
BDA (testemunha)		10,15 a	3,08 x 10 ⁴	5,24 cd	18,33 x 10 ⁴
Teste F		0,62 ^{NS}		726,17**	
d.m.s.		1,33		0,54	
C.V. (%)		4,39		2,51	

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

- não determinada

No primeiro experimento, não ocorreu diferença significativa na esporulação de todos os tratamentos, incluindo a testemunha. Já no segundo experimento, os óleos de eucalipto e gengibre não diferiram da testemunha quanto à esporulação. Parece ter havido um estímulo à esporulação nos tratamentos à base de nim e alecrim, sendo estes significativamente superiores à testemunha e aos dois óleos anteriormente citados.

Os resultados nos testes *in vitro* do presente trabalho concordam com os obtidos por Valarini et al. (1995), trabalhando com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) a 10 %, observaram 100% de inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. Resultados semelhantes já haviam sido apresentados por outros autores. Inácio et al. (2009), que também observaram inibição total do crescimento micelial das colônias de *Phomopsis phaseoli* var. *sojae* e *Fusarium* sp., pelos óleos essenciais de capim-cidreira (capim limão), citronela e eucalipto, entre outros. Carnelossi et al. (2009) e Silva et al. (2009) observaram a total inibição do desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, pela ação do óleo essencial de capim-limão, enquanto Souza Júnior et al. (2009) verificaram total inibição da germinação de esporos do mesmo patógeno e mesmo óleo. Segundo Guimarães et al. (2011) e Combrinck et al. (2011), o óleo essencial de capim-limão é rico em citral e limoneno, compostos estes com comprovada ação fungitóxica.

Os resultados obtidos para os óleo essenciais de cravo e capim limão nesta pesquisa também estão de acordo com aqueles observados por Rozwalka et al. (2008), onde estes óleos inibiram 100% do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* (ambos) e *Glomerella cingulata* (apenas o de capim-limão). Estes resultados indicam a potencialidade de uso do óleo essencial de cravo e capim limão no controle de diferentes fungos fitopatogênicos.

Segundo observado por Bernardo et al. (1998), o óleo essencial de manjerição, entre outros, proporcionou 100% de inibição na germinação e no crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola*. Da mesma maneira, Stangarlin et al. (1999), testando óleos de diferentes espécies botânicas visando o controle de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora* sp. e *Colletotrichum graminicola*, constataram total inibição do desenvolvimento micelial destes fungos com o óleo de manjerição. Os resultados obtidos na presente pesquisa estão de acordo com os obtido pelos autores anteriormente citados, comprovando o bom desempenho *in vitro* deste óleo, também evidenciando seu potencial para o controle de fitopatógenos.

Conforme apresentado anteriormente, os óleos de eucalipto citriodora e citronela apresentaram excelente efeito inibitório sobre *P. sojae*, em todas as concentrações no primeiro experimento, porém permitiram o crescimento e a esporulação deste em algumas concentrações, no segundo experimento. Schwan-Estrada et al. (1998) constataram que a redução no crescimento micelial variou para os fungos *Sclerotium rolfsii* (100%), *Rhizoctonia solani* (73%), *Phytophthora* sp (66%) e *Altenaria alternata* (50%) para alíquotas de 100 µL do óleo essencial de eucalipto. Souza et al. (2006), utilizando óleos essenciais de citronela, eucalipto (*E. globulus*) e citros, avaliaram o crescimento micelial *in vitro* dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani* e observaram que o óleo de citronela inibiu 100% do crescimento micelial de ambos os fungos, a partir da dose de 1.000 ppm, enquanto os outros dois óleos testados não proporcionaram resultados significativos sobre *C. lindemuthianum*, em nenhuma das concentrações testadas. Medice et al. (2007) observaram efeito direto dos óleos de eucalipto citriodora (1,0%), citronela (0,5%), nim (1,0%) e tomilho (0,3%) sobre o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, o qual teve a germinação de seus uredinósporos totalmente inibida por estes óleos. Costa et al. (2008) constaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de citronela sobre isolados de *Erwinia carotovora*, obtidos a partir de plantas de alface e repolho com sintomas de podridão mole. Em estudos de caracterização da composição de óleo essencial de citronela, Castro et al. (2007) observaram que os constituintes majoritários deste óleo foram citronelal e geraniol, este último com comprovada atividade antibacteriana. Segundo Stangarlin et al. (1999), o eucalipto também apresenta estes compostos em sua composição química, além de outros, que conferem ao óleo essencial propriedades antimicrobianas. O potencial fungistático dos óleos varia de acordo com a concentração utilizada, o gênero e a espécie do patógeno, podendo ser influenciada por fatores externos, como ocorreu no presente estudo, onde os óleos tiveram comportamento diverso nos dois experimentos conduzidos.

Os resultados do óleo de alecrim no primeiro ensaio desta pesquisa concordam com os obtidos por Souza (2001), que observaram alta eficiência deste óleo em inibir o crescimento e a esporulação do fungo *Lasiodiplodia theobromae*. No presente estudo, no entanto, esta eficiência não se repetiu, provavelmente pelos motivos apontados no parágrafo anterior.

O gengibre não apresentou desempenho satisfatório em ambos os ensaios, permitindo o crescimento e alta esporulação deste fungo. Gonçalves et al. (2009) investigaram o efeito de óleos essenciais (concentração 20%) e extratos vegetais (2mg/mL)

no controle de alguns patógenos da cultura da soja, verificaram que o óleo de gengibre reduziu em 75% a incidência de *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. e *Fusarium* spp. nos grãos, indicando a potencialidade antifúngica deste óleo. O efeito insatisfatório observado no presente trabalho pode ser devido às concentrações adotadas e ao patógeno-alvo, sendo recomendada a investigação com outras concentrações.

Os resultados obtidos com o óleo de nim nesta pesquisa não foram satisfatórios, uma vez que as informações da literatura apontam a eficácia dos produtos desta planta na proteção de plantas e animais domésticos contra pragas e patógenos diversos. Embora tenha apresentado porcentagens de inibição de crescimento acima de 90%, em todas as concentrações no segundo ensaio, verificou-se um estímulo à esporulação de *P. sojae*, totalmente indesejável no que se refere ao controle do fungo. Cruz-Triana e Rivero-Gonzalez (2009) verificaram que o óleo de nim comercial, na concentração de 25%, reduziu em 40% o crescimento de *R. Solani*, porcentagem esta que pode ser considerada baixa se compararmos, por exemplo, aos 100% obtidos com óleo de citronela, sobre o mesmo fungo, por Souza et al. (2006). Portanto, assim como observado para o óleo de gengibre, seria interessante a investigação de novas concentrações para o nim.

4.2 Efeito do tratamento de sementes com óleos essenciais sobre a incidência de *Phomopsis sojae* e o potencial fisiológico das sementes

4.2.1 Efeito do tratamento na sanidade das sementes

De acordo com o teste de sanidade (Tabela 3), todos os óleos aplicados às sementes, nas duas concentrações, resultaram em menor incidência de *P. sojae*, diferindo da testemunha inoculada. Embora, de maneira geral, não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos, percebe-se que a recuperação do fungo foi maior nas concentrações menores, para os três óleos essenciais.

A acentuada redução na incidência de *P. sojae* nas sementes tratadas comprova a ação antifúngica dos óleos empregados, constatada nos testes *in vitro*. Pelas características deste tipo experimento, onde grande variação entre as repetições é comum, não se observou diferença significativa entre os tratamentos quanto à recuperação de *P. sojae* nas sementes, mas convém ressaltar a eficiência do óleo de

cravo, na concentração 0,50%, que resultou em ausência do fungo nas sementes tratadas. De acordo com estudos realizados, o cravo possui até 90% de óleos essenciais em sua composição química, sendo o eugenol seu componente mais abundante (PAOLI et al., 2007; PEREIRA et al., 2008). Segundo Amaral e Bara (2005), Park et al. (2007) e Nzeako e Lawati (2008), este componente apresenta comprovada atividade antifúngica e antibacteriana, o que explica os resultados obtidos para este óleo no presente experimento.

Tabela 3. Incidência de *Phomopsis sojae* em sementes de soja BMX Potência RR, submetidas ao tratamento com óleos essenciais. Botucatu, SP, 2014.

Tratamento	Incidência de <i>Phomopsis sojae</i>	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹
1 Capim limão, 0,25%	13,50 b	9,0
2 Capim limão, 0,50%	3,69 bc	2,0
3 Cravo, 0,25%	9,00 bc	6,0
4 Cravo, 0,50%	0,00 c	0,0
5 Manjerição, 0,25%	7,37 bc	4,0
6 Manjerição, 0,50%	1,84 c	1,0
7 Testemunha inoculada	25,16 a	19,0
8 Testemunha não inoculada	0,00 c	0,0
F	10,81**	
Dms	11,45	
CV (%)	108,36	

a, b, c... – na coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹ dados originais

Segundo Abreu (2006), o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre fitopatógenos vem sendo amplamente investigado. No entanto, a maior parte das pesquisas direciona-se ao estudo dos efeitos *in vitro* deste óleo, sendo mais reduzidas as informações sobre seu efeito *in vivo*. Nguefack et al. (2005) avaliaram a ação antibacteriana de cinco óleos essenciais, e observaram atividade inibitória moderada do óleo de capim limão sobre cinco bactérias que infectam sementes de arroz; os óleos que apresentaram efeito inibitório mais expressivo, de tomilho e alfavaca, foram testados em tratamento de sementes e promoveram a redução de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. Nguefack et al. (2008) observaram que os óleos essenciais de capim limão, alfavaca e tomilho também proporcionaram controle de fungos em sementes de arroz, variando de 48% a 100%; para o capim limão, foi observado um controle de 48% para *Alternaria padwickii*, 93% para *Bipolaris oryzae* e 95% para *Fusarium moniliforme*. Além do controle dos fungos nas sementes, também foi constatada uma redução na taxa de transmissão dos

referidos fungos das sementes para as plantas, indicando que os óleos testados têm potencial como agentes de controle de fungos nas sementes. Os autores atribuíram tal efeito à composição química dos óleos. Em seus estudos, Nguefack et al. (2007) verificaram que o óleo de capim limão era rico em monoterpenos, sendo o principal componente dessa classe o citral (neral e geranial), que possui forte ação antimicrobiana.

Em estudos de caracterização da composição química do óleo de manjerição, Blank et al. (2004; 2007) e Rosado et al. (2011) verificaram que o componente majoritário deste óleo é o linalol, que tem comprovada ação fungicida, acaricida e bactericida. No presente trabalho, a ação fungicida do óleo foi também comprovada no tratamento de sementes de soja, reduzindo a incidência do fungo *P. sojae*.

A eficiência em reduzir a incidência de fungos em sementes mediante o tratamento com óleos essenciais observada na presente pesquisa está de acordo com os resultados de Araujo Neto et al. (2012), que observaram que o tratamento das sementes de erva doce com óleo de anis (concentrações variando de 1,0% a 2,5%) promoveu 100% de controle do fungo *Cladosporium* sp. em todas as concentrações testadas e redução crescente de *Alternaria* sp. com o aumento das concentrações do óleo. Resultados semelhantes com o emprego do óleo de anis em tratamento de sementes também foram observados por Medeiros et al. (2011) e Leite et al. (2011), que constaram erradicação da micoflora das sementes tratadas de flamboyant mirim e sabiá, respectivamente.

4.2.2 Efeito do tratamento no potencial fisiológico das sementes

O teste de germinação (Tabela 4) revelou que a presença do fungo não interferiu na germinação das sementes, não sendo observada diferença de plântulas normais entre as testemunhas inoculada e não inoculada. Neste teste, só houve diferença significativa entre os tratamentos à base de cravo, onde foi observada uma germinação de 82%, na concentração 0,25% (maior porcentagem de germinação), e de 66%, na de 0,50% (menor porcentagem de germinação). No entanto, convém ressaltar que esses dois tratamentos não diferiram dos demais tratamentos testados, incluindo as testemunhas. Também é importante destacar que apenas no tratamento com óleo de cravo a 0,25% foi verificada uma porcentagem de germinação acima da mínima exigida para a produção e

comercialização de sementes certificadas de soja (BRASIL, 2013). No caso de produção e comercialização de sementes básicas, a germinação mínima exigida é de 75%.

Tabela 4. Germinação de sementes de soja BMX Potência RR, submetidas ao tratamento com óleos essenciais. Botucatu, SP, 2014.

Tratamento	Plântulas normais		Plântulas anormais		Sementes mortas	
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹
1 Capim limão, 0,25%	57,17 ab	70,5	27,94 abc	22,0	15,18 a	7,5
2 Capim limão, 0,50%	55,62 ab	68,0	25,91 abcd	19,5	20,66 a	12,5
3 Cravo, 0,25%	64,98 a	82,0	15,82 d	8,0	15,87 a	8,0
4 Cravo, 0,50%	54,44 b	66,0	33,43 a	30,5	9,88 a	4,0
5 Manjerição, 0,25%	62,96 ab	79,3	21,02 bcd	13,0	16,37 a	8,0
6 Manjerição, 0,50%	62,52 ab	78,0	22,33 bcd	15,0	14,94 a	7,0
7 Testemunha inoculada	55,28 ab	67,5	29,59 ab	24,5	16,10 a	8,0
8 Testemunha não inoculada	63,05 ab	79,0	18,74 cd	11,0	17,82 a	10,0
F	3,62**		6,72**		1,61 ^{NS}	
dms	10,51		10,68		11,18	
CV (%)	7,55		18,74		30,13	

a, b, c... – em cada coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹ dados originais

Considerando-se as plântulas anormais, novamente o melhor resultado foi obtido com o tratamento à base de óleo de cravo a 0,25%, onde se observou baixa porcentagem de plântulas anormais, porém sem diferir dos demais óleos e testemunha não inoculada. Por outro lado, o mesmo óleo (cravo) na concentração maior (0,50%) resultou em maior porcentagem de plântulas anormais, não diferindo apenas da testemunha inoculada. Com relação às sementes mortas, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Se já são reduzidos os estudos sobre o emprego de óleos essenciais e seus efeitos no tratamento de sementes visando à sanidade destas, com relação aos efeitos na germinação e vigor, a situação não é diferente. Alguns trabalhos relatam efeito positivo dos óleos na germinação, com um incremento nas taxas germinativas de sementes tratadas, outros relatam efeito alelopático, com acentuado decréscimo da germinação, e há também aqueles em que não se observa diferença significativa em relação a testemunhas não tratadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho para o óleo de cravo concordam com os observados por Brito et al. (2010), ao tratarem sementes de mandacaru com óleo essencial de canela em concentrações de 0%; 0,5%; 1,0% e 2,0%. Estes autores

observaram que o óleo proporcionou a máxima germinação das sementes na menor concentração, porém, nas duas maiores foi observada uma redução nesta variável. Segundo os autores, o efeito inibitório do óleo de canela pode ser devido à concentração de ácido cinâmico, componente majoritário deste óleo. No mesmo trabalho, Brito et al. (2010) relatam que o óleo de manjerição, empregado nas mesmas concentrações do de canela, interferiu negativamente na germinação, que diminuiu com o aumento da concentração do óleo. Resultados semelhantes, com o óleo de canela, haviam sido observados por Alves et al. (2004), que constataram que a germinação de sementes de alface não foi influenciada por concentrações de 0,001% e 0,01%, mas foi inibida pelas concentrações de 0,1% e 1,0%. Segundo Simões e Spitzer (1999), ácido cinâmico é indiretamente responsável pela inibição da germinação de sementes e do crescimento das plantas. De acordo com Lorenzi e Matos (2002), os compostos químicos constituintes do óleo essencial de manjerição, entre eles, o linalol e o eugenol, em uma concentração elevada podem ter efeito negativo na germinação de sementes.

O efeito na germinação, observado nesta pesquisa, também está de acordo ao observado por Araujo Neto et al. (2012), que verificaram que o óleo de anis proporcionou um aumento na germinação de sementes de erva doce, embora não tenham sido constatadas diferenças significativas entre algumas concentrações e a testemunha não tratada. Por outro lado, Brito et al. (2012) observaram drástica redução na germinação de sementes de milho tratadas com óleos de citronela, eucalipto e composto citronelal em relação à testemunha. Já Mieth (2007) observou que o tratamento com extrato de hortelã promoveu uma redução na incidência de fungos em sementes de *Cedrella fissilis* e não interferiu na germinação das sementes.

Embora sem apresentar diferença significativa para a testemunha não inoculada e não tratada, os resultados obtidos para o óleo de capim limão, neste trabalho, não podem ser considerados bons, pois a taxa de germinação de plântulas normais está bem abaixo do padrão mínimo exigido até para sementes básicas. No caso do óleo de manjerição, as taxas germinativas estiveram bem próximas da testemunha, com um leve incremento (não significativo estatisticamente) na concentração menor, o que sugere que um ajuste na concentração deste óleo no tratamento de sementes pode gerar resultados mais satisfatórios. Com relação ao óleo de cravo, a diferença significativa observada entre as duas concentrações também demonstra que o ajuste do tratamento pode levar a resultados melhores. Segundo Souza Filho et al. (2009), a intensidade dos efeitos

potencialmente alelopáticos varia em função da concentração dos compostos químicos, o que explica os resultados obtidos no presente trabalho.

Os resultados dos testes de vigor realizados em laboratório, primeira contagem de germinação e comprimento de plântulas, estão na Tabela 5. O teste de primeira contagem de germinação revelou que os melhores resultados foram obtidos pela testemunha não inoculada (69,0%) e pelo óleo de manjerição a 0,25% (68,0%), seguidos de óleo de cravo a 0,25%. Este último, porém, também não diferiu da maioria dos demais tratamentos, incluindo a testemunha inoculada. Os resultados do teste de comprimento de plântulas não revelaram diferenças significativas entre os tratamentos. De maneira surpreendente, embora sem diferir dos demais tratamentos, o maior comprimento foi observado na testemunha inoculada.

Os resultados do teste de primeira contagem mostram que, embora sem haver diferenças significativas entre as concentrações de capim limão e de cravo, verifica-se uma tendência de diminuição da porcentagem de germinação com o aumento da concentração, efeito esse verificado de forma concreta para o óleo de manjerição. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Brito et al. (2010), que verificaram efeito positivo para o tratamento de sementes de mandacaru com óleo de canela somente na concentração mais baixa (0,5%), promovendo um decréscimo das sementes germinadas, no teste de primeira contagem, à medida que se aumentou a concentração do óleo (1,0% e 2,0%). De maneira contrária, neste teste, os autores obtiveram efeito negativo do óleo de manjerição na germinação, em todas as concentrações testadas, ao passo que, no presente trabalho, na concentração 0,25%, o óleo de manjerição foi o que proporcionou a maior germinação das sementes (68%), com valor bem próximo ao da testemunha não inoculada. Mais uma vez, a composição e concentração química dos óleos têm seus efeitos comprovados sobre as características fisiológicas das sementes. Segundo Reigosa et al. (1999), os efeitos aleloquímicos nos diferentes processos fisiológicos de uma planta. Embora os óleos tenham promovido efeitos diversos no vigor, medido no teste de primeira contagem de germinação, não houve interferência negativa dos mesmos no comprimento das plântulas.

Tabela 5. Primeira contagem de germinação de sementes e comprimento de plântulas de soja BMX Potência RR, submetidas ao tratamento com óleos essenciais. Botucatu, SP, 2014.

Tratamento	Plântulas normais		Comprimento (cm)
	arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹	
1 Capim limão, 0,25%	40,97 bc	43,0	15,6 a
2 Capim limão, 0,50%	36,23 c	35,0	14,1 a
3 Cravo, 0,25%	50,24 ab	59,0	14,5 a
4 Cravo, 0,50%	41,82 bc	44,5	15,6 a
5 Manjeriço, 0,25%	55,57 a	68,0	15,1 a
6 Manjeriço, 0,50%	36,51 c	35,5	15,2 a
7 Testemunha inoculada	40,94 bc	43,0	16,2 a
8 Testemunha não inoculada	56,30 a	69,0	15,3 a
F	15,13**		1,29 ^{NS}
dms	9,74		2,74
CV (%)	9,28		7,70

a, b, c... – em cada coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹ dados originais

Na Tabela 6, encontram-se os dados de índice de velocidade de emergência, emergência final e altura e matéria seca de plântulas, obtidos em ensaio de casa de vegetação.

Tabela 6. Índice de velocidade de emergência (IVE), emergência final, altura e matéria seca de plântulas de soja BMX Potência RR, oriundas de sementes submetidas ao tratamento com óleos essenciais. Botucatu, SP, 2014.

Tratamento	IVE	Emergência final		Altura de plantas (cm)	Matéria seca (g)
		arc sen $\sqrt{(x/100)}$	(%) ¹		
1 Capim limão, 0,25%	11,0 a	61,5 a	75,0	23,5 a	0,493 a
2 Capim limão, 0,50%	9,1 a	60,3 a	74,5	22,0 a	0,462 a
3 Cravo, 0,25%	12,0 a	72,8 a	90,5	24,8 a	0,473 a
4 Cravo, 0,50%	12,2 a	68,4 a	86,0	24,4 a	0,467 a
5 Manjeriço, 0,25%	11,4 a	69,8 a	88,0	23,7 a	0,477 a
6 Manjeriço, 0,50%	12,2 a	73,3 a	91,5	24,7 a	0,486 a
7 Testemunha inoculada	11,0 a	64,7 a	81,0	24,8 a	0,472 a
8 Testemunha não inoculada	12,1 a	66,8 a	84,0	24,8 a	0,451 a
F	1,51 ^{NS}	1,59 ^{NS}		0,35 ^{NS}	1,01 ^{NS}
dms	4,02	19,94		7,86	0,062
CV (%)	15,14	11,41		13,96	5,59

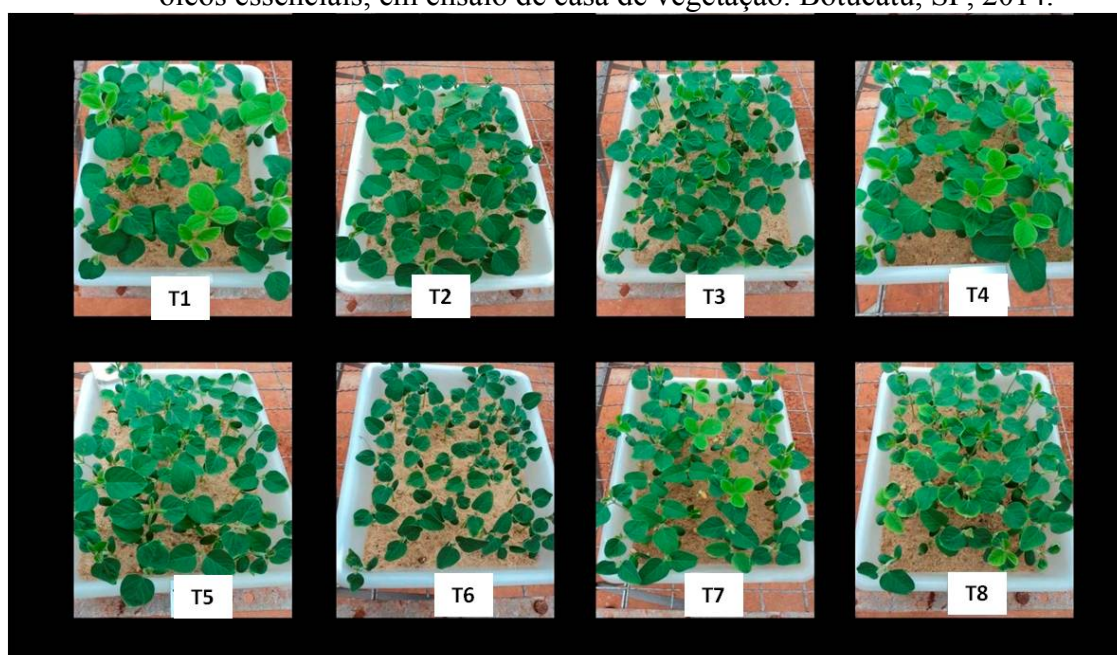
a – em cada coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹ dados originais

O tratamento de sementes com os óleos de capim-limão, cravo e manjeriço não interferiu no desenvolvimento das plântulas em ensaio de casa de

vegetação, não sendo observadas diferenças significativas entre todos os tratamentos para as variáveis estudadas (índice de velocidade de emergência, estande (emergência final), altura de plantas e matéria seca). É importante ressaltar, também, que não houve desenvolvimento de sintomas de toxidez às plântulas em função da aplicação dos óleos (Figura 2). Os resultados do teste de casa de vegetação reforçam a potencialidade de uso dos óleos essenciais de capim limão, cravo e manjerição no tratamento de sementes de soja, uma vez que não houve interferência negativa no desenvolvimento inicial das plântulas.

Figura 1. Plântulas de soja BMX Potência RR, oriundas de sementes tratadas com óleos essenciais, em ensaio de casa de vegetação. Botucatu, SP, 2014.



T1: óleo essencial de capim limão, 0,25%; T2: óleo essencial de capim limão, 0,50%; T3: óleo essencial de cravo, 0,25%; T4: óleo essencial de cravo, 0,50%; T5: óleo essencial de manjerição, 0,25%; T6: óleo essencial de manjerição, 0,50%; T7: testemunha inoculada; T8: testemunha não inoculada.

Os resultados desta pesquisa reforçam a necessidade de maiores pesquisas envolvendo ensaios *in vivo* para se recomendar o emprego de óleos essenciais no tratamento de sementes. Conforme discutido neste trabalho, pode-se perceber que existe uma variação muito grande de efeitos em função do óleo essencial escolhido, da concentração de óleo adotada para o tratamento, da espécie vegetal que será tratada com o óleo e do(s) patógeno(s) alvo(s). No entanto, fica clara a potencialidade de uso de óleos essenciais no tratamento de sementes como uma forma alternativa de manejo de doenças de plantas.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições em que os experimentos foram conduzidos, permitem concluir que: os óleos essenciais de capim limão, cravo e manjerição inibem o desenvolvimento de *Phomopsis sojae* e apresentam possibilidade de uso no tratamento de sementes de soja visando o controle deste fungo, uma vez que reduzem sua incidência nas sementes tratadas e não interferem na qualidade fisiológica destas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C.L.M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 71f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A. GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 3. ed. v.2. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.569-588.
- ALMEIDA, T.F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. de C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.196-201, 2009.
- ALVES, M.C.S.; MEDEIROS FILHO, S.; INECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- AMADIOHA, A.C. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. **Crop Protection**, v.19, n.5, p.287-90, 2000.
- AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, p.5-8, 2005.
- ARAÚJO NETO, A.C.A.; ARAÚJO, P.C.; SOUZA, W.C.O.; MEDEIRO, J.G.F.; AGUIAR, A.V.M. Óleo essencial de anis na incidência e controle de patógenos em sementes de erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Revista Verde**, Mossoró – RN, v.7, n.1, p.170-176, 2012.
- BACKMAN, P.A. *Diaporthe-Phomopsis* complex: stem canker. In: BACKMAN, P.A. **Compendium of soybean diseases**. 3. ed, Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1993. p.72-83.
- BALDUCCHI, A.J.; MCGEE, D.C. Environmental factors influencing infection of seeds by *Phomopsis* and *Diaporthe* species during seed maturation. **Plant Disease**, Saint Paul, v.71, n.3, p.209-212, 1987.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N.K. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 237p.
- BARD, M.; ALBRECHT, M.; GUPTA, N.; GUYNN, C. J.; STILLWELL, W. Geraniol interfere with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, Champaign, v. 23, p. 534-538, 1988.

BARROS, S.T.; OLIVEIRA, N.T.; MAIA, L.C. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial de *Curvularia* spp e *Alternaria* spp. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.168-70, 1995.

BASTOS, C.N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palmivora* por extrato de bulbo de alho. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.454-7, 1992.

BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.5, p.555-557, 2004

BELÉM, L.F. **Efeitos de fungicidas químicos e de produtos vegetais no desenvolvimento “in vitro” de fungos que afetam sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante o armazenamento.** Areia, PB, 1997. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal da Paraíba, UFPB

BENATO, E.A.; SIGRIS, J.M.M.; HANASHIRO, M.M.; MAGALHÃES, M.J.M.; BINOTTI, C.S. Avaliação de fungicidas e produtos alternativos no controle de podridões pós-colheita em maracujá-amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.299-304, 2002.

BERNARDO, R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Fungitoxidade de alguns óleos essenciais contra fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.227, 1998.

BISHT, V.S.; SINCLAIR, J.B. Effect of *Cercospora sojina* and *Phomopsis sojiae* alone or in combination on seed quality and yield of soybeans. **Plant Disease**, Saint Paul, v.69, n.5, p.436-439, 1985.

BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M. Efeito do período e da temperatura de armazenamento na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja com altos índices de *Phomopsis sojiae* (Leh.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.2, p.296-303, 1997.

BLANK, A.F.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; SANTOS NETO, A.L.; ALVES, P.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M.C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.113-116, 2004.

BLANK, A.F.; SOUZA, E.M.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; ALVES, P.B. Novas cultivares Maria Bonita: cultivar de manjerição tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.12, p.1811-1813, 2007.

BOLKHAN, H.A.; RIBEIRO, W.L. Efeito do extrato de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.565-6, 1981.

BOLKHAN, H.A.; SILVA, A.R.; CUPERTINO, F.P. Fungi associated with soybean and bean seeds and their control in Central Brazil. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v.60, n.6, p.545-548, 1976.

BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TESSMANN, D.J.; SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.128-134, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária: Brasília, 2009. 395p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº45, de 17 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2013, seção 1, p.6.

BRITO, D.R.; OOTANI, M.A.; RAMOS, A.C.C.; SERTÃO, W.C.; AGUIAR, R.W.S. Efeito dos óleos de citronela, eucalipto e composto citronelal sobre micoflora e desenvolvimento de plantas de milho. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v.3, n.4, p.184-192, 2012.

BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. COELHO, M. S. E.; FÉLIX, L. P.; Efeitos de óleos essenciais na germinação de sementes de *Cereus jamacaru*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.2, p.207-211, 2010.

CARNEIRO, S.M.T.P.G. Ação do nim sobre fungos fitopatogênicos. In: MARTINEZ, S.S. **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2002. p.59-64.

CARNEIRO, S.M.T.P.G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.3, p.262-265, 2003.

CARNEIRO, S.M.T.P.G.; PIGNONI, E.; GOMES, J.C. Efeito do nim (*Azadirachta indica* A. JUSS.) no controle da mancha angular do feijoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.3, p.6-10, 2008.

CARNELOSSI, P.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; MESQUINI, R.M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.399-406, 2009.

CARVALHO, J.B.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BONALDO, S.M.; CRUZ, M.E.S.; CARLOS, M.M.; STANGARLIN, J.R. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.88-93, 2008.

CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; LEAL, T. C. A. B.; SOUZA, C. M.; NAZARENO, A.C. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 55-61, 2007.

CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.D. Efeito do extrato de óleo industrial de alho sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.234-5, 1987.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v.33, p.344-349, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: **safra 2013/2014**: segundo levantamento. Brasília, DF. 2013. 63 p.

COSTA, C. M. G. R.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; AGRA, P. F. M.; FARIAS, M. A. A. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.2, n.2, p.11-14, 2008.

COUTINHO, W.M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeito de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos Benomyl e Captan sobre a micoflora e qualidade fisiológica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.560-568, 1999.

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

CRUZ TRIANA, A.; RIVERO GONZÁLEZ, D. Efecto del OleoNim 50 CE sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos del arroz (*Oryza sativa* Lin.). **Fitosanidad**, v.13, n.4, p.271-276, 2009.

DEFFUNE, G. Fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal: a explicação dos defensivos naturais. **Agroecologia Hoje**, v.1, n.6, p.6-8, 2001.

DINIZ, S.P.S.S.; COELHO, J.S.; ROSA, G.S.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA, R.R. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.4, p.9-11, 2008.

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. **Circular Técnica** n.9, 1984. 39p.

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. Diacom: diagnóstico completo da qualidade de sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1992. 22p. (Circular Técnica,10).

FRANÇA NETO, J.B.; WEST, S.H. Problems in evaluating viability of soybean seed infected with *Phomopsis* spp. **Journal of Seed Technology**, Springfield, v.13, n.2, p.122-135, 1989.

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A.; EIRA, M.T.S. Implantação dos testes de sanidade como rotina em laboratório de análise de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.7, n.1, p.213-220, 1985.

FRANCO, D.A.; BETTIOL, W. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citrus com produtos alternativos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.602-606, 2000.

FRANZENER, G.; MOURA, G. S.; MEINERZ, C. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extrato aquoso de *Corymbia citriodora* no controle alternativo da antracnose em pepino e do cretamento bacteriano em feijão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROPECUÁRIA, 7., 2011, Fortaleza. **Anais...** Ceará: Cadernos de Agroecologia, 2011. p. 1-5.

GLEASON, M.L.; FERRIS, R.S. Influence of soil water potencial on performance of soybean seeds infected by *Phomopsis* sp. **Phytopathology**, Saint Paul, v.75, n.11, p.1236-1241, 1985.

GONÇALVES, E.P.; ARAÚJO, E.; ALVES, E.U.; COSTA, N.P. da Tratamento químico e natural sobre a qualidade fisiológica e sanitária em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas. **Revista Biociências**, Taubaté, v.9, n.1, p.23-29, 2003.

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.S102-107, 2009. (Suplemento)

GOULART, A.C.P. **Tratamento de sementes de soja com fungicidas**: recomendações técnicas. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1998. 32p. (Circular Técnica, 8).

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUSA, P. E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.464-472, 2011.

GUINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2000.

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

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. Problemas na avaliação da germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.2, n.3, p.9-22, 1980.

HEPPERLY, P.R.; SINCLAIR, J.B. Quality losses in *Phomopsis* infected soybean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v.68, n.12, p.1684-1687, 1978.

INÁCIO, M. M.; PASCUALI, L. C.; ZELA, S. P.; PAULA, P. R.; Diagnósticos de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de *Phomopsis phaseoli* var. *sojae*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*. In: JORNADA CIENTÍFICA DA UNEMAT, 2., 2009, Barra do Bugres. **Anais...** Barra do Bugres: UNEMAT, 2009.

KHAN, M.I. Effect of *Nicotiana* spp. on seed mycoflora of wheat. **Indian Journal of Applied and Pure Biology**, Bopthal, v.4, n.1, p.69-71, 1989.

- KISHORE, G.K.; PANDE, S.; RAO, J.N. Control of late leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea*) by extracts from non-host plant species. **The Plant Pathology Journal**, v.17, n.5, p.264-70, 2001.
- KMETZ, K.T.; ELLETT, C.W.; SCHMITTHENNER, A.F. Soybean seed: sources of inoculum and nature of infection. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, n.7, p.798-801, 1979.
- KOUL, O.; ISMAN, M.B.; KETKAR, C.M. Properties and 10 uses of neem, *Azadirachta indica*. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.1-11, 1990.
- KULIK, M.M.; SCHOEN, J.F. Effect of seedborne *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* on germination, emergence, and vigor of soybean seedlings. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, n.5, p.544-547, 1981.
- KUMAR, S. Performance of leaf extracts preservation of padaly seed. **Seed Research**, New Delhi, v.18, n.1, p.95-97, 1990.
- KUNWAR, I.K.; SINGH, T.; SINCLAIR, J.B. Histopathology of mixed infection by *Colletotrichum truncatum* and *Phomopsis* spp. or *Cercospora sojae* in soybean. **Phytopathology**, Saint Paul, v.75, n.4, p.489-492, 1985.
- LEITE, R. P.; MEDEIROS, J. G. F.; NASCIMENTO, L. C. Produtos naturais e seus efeitos sobre a micoflora e fisiologia em sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). In: SEABRA, G.; MENDONÇA, I. (Eds.). **Educação ambiental: Responsabilidade para a conservação da sociobiodiversidade**. João Pessoa: Editora Universitária, 2011. p.559-564.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**. Nativas e exóticas. 1 ed. São Paulo: Editora Plantarum, 2002. 544 p.
- LUCENA, J.A.M.; CASELA, C.R.; GASTAL, M.F.C. Doenças da soja. In: VERNETTI, F.J. **Soja: planta, clima, pragas, moléstias e invasoras**. v.1. Campinas: Fundação Cargill, 1983. p.385-389.
- MACEDO, L.P.M. **Micoflora e germinação de sementes de pimentão** (*Capsicum annuum* L.) **tratadas com produtos químicos e óleo de piqui** (*Cariocar brasiliensis* Camb.). 26f. (Trabalho de conclusão de curso)-Universidade Federal da Paraíba, Areia, 1997.
- MAGALHÃES, F.H.L. **Efeito dos óleos de piqui** (*Cariocar brasiliensis* Camb), **dendê** (*Elaeis guianensis* L.), **dos fungicidas químicos Benomyl e Captan sobre a microflora e qualidade fisiológica de sementes de feijão** (*Phaseolus vulgaris* L). 1996. 32f. (Trabalho de conclusão de curso)-Universidade Federal da Paraíba, Areia, 1996.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MARQUES, M.W.; COILA, V.H.C.; LOPES, R.A.M.; NAUE, C.R.; LIMA, N.B.; ROSSETO, E.A. Avaliação da atividade antifúngica do extrato de *Eucalyptus* sp. sobre o crescimento de fitopatógenos. In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, Universidade Federal de Pelotas. 2008.

MARTINEZ, S.S. Composição do nim. In: MARTINEZ, S.S.. **O Nim - *Azadirachta indica***: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002. p.23-30.

McGEE, D.C.; BRANDT, C.L.; BURRIS, J.S. Seed mycoflora of soybeans relative to fungal interactions, seedling emergence and carry over of pathogens to subsequent crops. **Phytopathology**, Saint Paul, v.70, n.7, p.615-617, 1980.

MEDEIROS, D.C.; ANDRADE NETO, R.C.; FIGUEIRA, L.K.; NERY, D.K.P.; MARACAJÁ, P.B.; Pó de folhas secas e verdes de nim sobre a qualidade das sementes de feijão caupi. **Caatinga**, v.20, n.2, p. 94-99, 2007.

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

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; MAGNO JÚNIOR, R. G.; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.1, p.83-90, 2007.

MIETH, A. Micoflora e qualidade fisiológica de sementes de cedro (*Cedrela fissilis*) tratadas com extrato natural de hortelã (*Mentha piperita*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.2, n.2, p.1192-1195, 2007.

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

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

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Abrates: Londrina, 1999. cap. 2, p.1-24.

NGUEFACK, J.; SOMDA, I.; MORTENSEN, C.N.; AMVAM ZOLLO, P.H. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling seed-borne bacteria of rice (*Oryza sativa* L.) **Seed Science & Technology**, v.33, p.397-407, 2005.

NGUEFACK, J.; NGUIKWIE, S.K.; FOTIO, D.; DONGMO, B.; AMVAM ZOLLO, P.H. Fungicidal potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citrates*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* to control *Alternaria padwickii* and *Bipolaris oryzae*, two seed-borne fungi of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Essential Oil Research**, v.19, p.581-587, 2007.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; LEKAGNE DONGMO, J.B.; TORP, J.; AMVAM ZOLLO, P.H.; NYASSE, S. Use of three essential oils as seed treatments against seed-borne fungi of rice (*Oryza sativa* L.). **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.4, n.5, p.554-560, 2008.

NZEAKO, B.C.; LAWATI, B.A. Comparative studies of antimycotic potential of thyme and clove oil extracts with antifungal antibiotics on *Candida albicans*. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.11, p.1612-1619, 2008.

O MUNDO dependerá mais da soja do Cone Sul na safra 2012/2013. In: **AGRIANUAL - Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2013. p. 417-453.

OOTANI, M. A. **Atividade inseticida, antifúngica e herbitóxica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon nardus***. 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Produção Vegetal)- Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2010.

PAOLI, S.; GIANI, T.S.; PRESTA, G.A.; PEREIRA, M.O.; FONSECA, A.S.; BRANDÃO NETO, J.; MEDEIROS, A.C.; SANTOS FILHO, S.D.; BERNARDO FILHO, M. Effects of clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) on the Labeling of blood constituents with technetium and on the morphology of red blood cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.175-182, 2007.

PARK, M.J.; GWAK, K.S.; YANG, I.; CHOI, W.S.; JO, H.J.; CHANG, J.W.; JEUNG, E.B.; CHOI, I.G. Antifungal activities of the essential oil in *Syzygium aromaticum* and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. **The Journal of Microbiology**, v.45, n.5, p.460-5, 2007.

PASCHAL II, E.H.; ELLIS, M.A. Variation in seed quality characteristics of tropically grown soybeans. **Crop Science**, Madison, v.18, n.5, p.837-840, 1978.

PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M.G.; ABREU, L.R.; MORAIS, A.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.887-93, 2008.

PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; JÚNIOR, P. M. R.; ALVES, E. Óleo essencial de citronela no controle e na ativação de respostas de defesa do cafeeiro contra a ferrugem e cercosporiose. **Ciência e agrotecnologia**. Lavras, v. 36, n. 4, Jul/Ago. 2012.

PESKE, S.T. As sementes no contexto das inovações tecnológicas. 2012. Disponível em http://www.seednews.inf.br/html/site/content/reportagem_capa/index.php?edicao=62 Acesso em 10 fev 2013.

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

POPIA, A.F.; CIDADE JUNIOR, H.A.; HAMMERSCHMIDT, I.; TOLEDO, M.V.; ASSIS, O. **Manual de Olericultura Orgânica**. Curitiba: Emater/Seab. 2007. 128p.

REIGOSA, M. J.; SANCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZALES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.

REIS, M.S. A seca da haste e da vagem. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v.27, n.282, p.14-18, 1974.

RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – agente causal da podridão de frutos do mamoeiro. **Scientia Agrícola**, v.56, n.4, p.1267-1271, 1999.

ROSADO, L.D.S.; PINTO, J.E.B.P.; BOTREL, P.P.; BERTOLUCCI, S.K.V; NICULAU, E.S.; ALVES, P.B. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjerição cv. Maria Bonita. **Ciência e Tecnologia**, v.35, n.2, p.291-296, 2011.

ROSS, J.P. Effect of aphid-transmitted soybean mosaic virus on yields of closely related resistant and susceptible soybean lines. **Crop Science**, Madison, v.17, n.5, p.869-872, 1977.

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

SAITO, M.L.; LUCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, 46p.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4 ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.

SANTOS, M.B.; SANTOS, C.Y.; ALMEIDA, M.A.; SANTOS, C.R.S.; SANT'ANNA, H.L.S.; SANTOS, O.S.N.; SILVA, F.; MARTINS, G.N. Efeito inibitório *in vitro* de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.1, p.13-17, 2010.

SANTOS, P.M.; ALVES, E.S.S.; FERREIRA, W.S.; SANTOS, R.B.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Uso de formulações de óleos essenciais no controle da antracnose de frutos de mamão. **Fitopatologia Brasileira** v.29, Supl., p.125, 2004.

SCAPIN, C.R.; CARNELOSSI, P.R.; VIEIRA, R.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxidade *in vitro* de extratos vegetais sobre *Exserohilum turcicum* (PASS.) Leonard & Suggs. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.1, p.57-61, 2010.

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

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; BONALDO, S.; PASCHOLATI, S. F. Efeito do extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* no crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.24, p.74, 1998.

SHETTY, S.A.; PRAKASH, H.S.; SHETTY, H.S. Efficacy of certain plant extracts against seed-borne infection of *Trichoconiella padwickii* in padaly (*Oriza sativa*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.77, n. 7, p.1956–1958, 1989.

SILVA, A. C.; SALES, N. L. P.; ARAÚJO, A. V.; CALDEIRA JÚNIOR, C. F. Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, Edição Especial, p.1853 -1860, 2009.

SILVA, M.B.; NICOLI, A.; COSTA, A.S.V.; BRASILEIRO, B.G.; JAMAL, C.M.; SILVA, C.A.; PAULA JÚNIOR, T.J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.3, p.57-60, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora UFSC, 1999. cap. 8, p.397-425.

SINCLAIR, J.B. Phomopsis seed decay of soybeans – a prototype for studying seed disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v.77, n.4, p.329-334, 1993.

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. **Compendium of soybean diseases**. 3. ed. Saint Paul: APS Press, 1989. 106p

SOJA. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/plantas/soja/soja.html> Acesso em: 20 dez. 2013.

SOUZA, A.A. de; BRUNO, R. de L.A.; ARAÚJO, E.; BRUNO, G.B. Micoflora e qualidade fisiológica de sementes do algodoeiro tratadas com fungicidas químicos e extrato de aroeira. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.25, n.1, p.56-64, 2003.

SOUZA, A.E.F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L.C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.6, p.465-471. 2007.

SOUZA, D. C.; VILELA, G. R.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M.; ITO, M. A. Efeito de óleos no crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia*

solani. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3. 2006, Belém. **Anais...** Belém: UFP, 2006.

SOUZA FILHO, A. P. S.; BAYMA, J. C.; GUILHON, G.M. S. P.; ZOGHBI, M. G. B. Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. **Revista Plantas Daninhas**, v.27, p.499-505, 2009.

SOUZA, G.A.A.A. de. Ação antifúngica de óleos essenciais de espécies vegetais sobre *Lasiodiplodia theobromae*. In: CID, R. de C.C.; BEZERRA, F.F.; PIMENTEL, C.R.M.; ANDRADE, O.M. da S. (Ed.). **Coletânea de resumos de teses, dissertações e monografias**: convênios Embrapa Agroindústria Tropical e Universidades. Embrapa: Fortaleza. Documentos 45, p.89-91, 2001.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v.22, n.3, p.77-83, 2009.

SOUZA, R. M.; SERRA, I. M. R. S.; MELO, T. A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.1, Jan./Mar. 2012.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.16, p.265-304, 2008.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.1, p.16-21, 1999.

TANSEY, M.R.; APPLETON, J.A. Inhibition of fungal growth by garlic extract. **Mycologia**, v.67, p.409-413, 1975.

VALARINI, P. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; SPADOTTO, C. A. Potencial da erva medicinal *Cymbopogon citratus* no controle de fitopatógenos do feijoeiro e plantas daninhas em áreas irrigadas. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.303, 1995.

WRATHER, J.A.; STIENSTRA, W.C.; KOENNING, S.R. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1988. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.23, n.1, p.122-131, 2001.

YORINORI, J.T. **A soja no Brasil Central**. 3. ed., v.1. Campinas: Fundação Cargill, 1986. 444p.

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

ZANANDREA, I.; MOURA, A.B.; PIEROBOM, C.R.; BOBROWSKI, V.L.; LUDWIG, J.; SANTOS, J.; PACHOLSKI, I. Extratos de manjerição (*Occimum basilicum* L.)

utilizados para inibir o crescimento micelial de fungos patogênicos do arroz em microcultivo. In: XII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2003, Pelotas. XII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UFPEL.

ZANANDREA, I.; JULIANO, D. S.; ANDRÉA, B.M.; JULIANE, L.; VERIDIANA, K. B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimento micelial em placas. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 14, supl. 01, p.14-16, 2004.

ZORRILA, G.; KNAPP, A.D.; McGEE, D.C. Severity of Phomopsis seed decay, seed quality evaluation, and field performance of soybean. **Crop Science**, Madison, v.34, n.1, p.172-177, 1994.