**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico de
sementes de feijão para controle de *Fusarium oxysporum*
f. sp. *phaseoli***

Mariane Sayuri Ishizuka

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2016**

Mariane Sayuri Ishizuka
Engenheira Agrônoma

**Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico de sementes de feijão
para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Ishizuka, Mariane Sayuri

Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico de sementes de feijão para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* / Mariane Sayuri Ishizuka. - - Piracicaba, 2016.

96 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Phaseolus vulgaris* 2. *Trichoderma* 3. Antagonismo *in vitro* 4. Fungicidas
5. Qualidade fisiológica I. Título

CDD 635.652
I79c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Jorge e Elza,

Dedico com muito carinho

À Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz e ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia.

Ao Prof. Dr. José Otavio Machado Menten. Obrigada por ter me recebido tão atenciosamente, pelos incentivos e motivações profissionais transmitidos durante o curso. Foi uma honra tê-lo como orientador. Muito obrigada!

À querida Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes (Helô) pelo ótimo convívio que tivemos. Agradeço imensamente por toda a paciência, os ensinamentos, a orientação e acima de tudo, a amizade. Muito muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior, coordenador do Programa de Pós Graduação da Fitopatologia, por ouvir as solicitações e permitir minha participação como representante discente do programa.

Ao Corpo Docente do PPG- Fitopatologia, o qual foi responsável pela transmissão de conhecimentos científicos durante a minha formação.

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

À Dra. Margarida F. Ito, por ter cedido o isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* utilizado no presente trabalho.

Às empresas, Grupo Farroupilha e Koppert do Brasil pela disponibilização dos produtos avaliados na dissertação.

Aos colegas de laboratório, Luis Claudio Sturion, Muriel e Renata Linhares, pela enorme ajuda durante a condução dos experimentos.

À MSc. Meyrielle Pires de Camargo, por ter ensinado as metodologias de sensibilidade *in vitro* empregadas no trabalho.

A todos os amigos dos Laboratórios de Epidemiologia, Fitoplasmas, Virologia Vegetal, Fungos Fitopatogênicos, Genética da Interação Planta-Patógeno, Bioquímica e Fisiologia

Fitopatológica e Nematologia Vegetal. Levo comigo a amizade conquistada e um pouquinho de cada um de vocês.

Às amigas queridíssimas que ganhei durante o mestrado: Lillian Bibiano, Renata Linhares e Sarah Galvão. Obrigada por todos os dias felizes que compartilhamos juntas!

Às amigas, Bianca Minink, Bruna Miatelo e Sarina Tsui, pelo convívio diário em nossa casa. Foi tudo perfeito enquanto morávamos juntas.

Aos amigos piracicabanos Ana Claudia Dognini e Lucas Valarini, por terem me recebido tão alegremente nesta cidade.

Muito obrigada!

“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade”.

Cora Coralina

**Grande é a tarefa que nos espera...
Para todos os seres humanos, constitui quase um dever pensar que
o que já se tiver realizado é sempre pouco
em comparação com o que resta por fazer.
João XXIII**

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Aspectos gerais da cultura do feijoeiro.....	21
2.2 Aspectos econômicos da cultura do feijoeiro	23
2.3 Murcha-de-fusário	25
2.3.1 Ocorrência de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> no mundo e no Brasil.....	25
2.3.2 Etiologia da murcha de fusário	26
2.3.3 Epidemiologia da murcha de fusário	27
2.3.4 Sintomatologia da murcha de fusário	28
2.4 Importância da semente no desenvolvimento da doença	29
2.5 Manejo da murcha de fusário	31
2.5.1 Controle químico de <i>Fop</i> associado à semente	32
2.5.2 Controle biológico.....	33
2.5.3 Combinação entre produtos químicos e biológicos no tratamento de sementes	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Obtenção de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	37
3.2 Produtos à base de <i>Trichoderma</i> spp.	38
3.3 Teste de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. em cultura pareada.....	38
3.4 Teste de produção de metabólitos voláteis	39
3.5 Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Fop</i> e de <i>Trichoderma</i> spp. a fungicidas.....	39
3.5.1 Interferência <i>in vitro</i> de fungicidas no crescimento de <i>Fop</i>	39
3.5.2 Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. a fungicidas.....	42
3.6 Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico em sementes de feijão artificialmente inoculadas com <i>Fop</i>	43
3.6.1 Obtenção de sementes artificialmente inoculadas com <i>Fop</i>	43

3.6.2 Tratamento das sementes	43
3.6.3 Testes em laboratório e estufa	44
3.6.4 Análises Estatísticas	46
3.7 Determinação da taxa de transmissão de <i>Fop</i> a partir do substrato infestado ...	46
3.7.1 Preparo do inóculo.....	47
3.7.2 Tratamento das sementes	47
3.7.3 Infestação de <i>Fop</i> no substrato	47
3.7.4 Preparo das amostras.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Testes de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Fop</i> a <i>Trichoderma</i>	49
4.2 Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Fop</i> a fungicidas.....	53
4.3 Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico em sementes artificialmente inoculadas com <i>Fop</i>	68
4.4 Efeitos dos tratamentos químicos e biológicos em sementes de feijão na transmissão de <i>Fop</i> infestado no solo.....	77
5 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS	83

RESUMO

Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico de sementes de feijão para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Atualmente, a produtividade do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser reduzida devido à ocorrência de doenças em todo o território nacional, destacando-se a murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). No campo, o patógeno é disseminado a longas distâncias através das sementes infectadas e/ou contaminadas e a sua sobrevivência ocorre, principalmente, no solo. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a inibição do crescimento micelial de *Fop* por *Trichoderma* spp.; classificar a sensibilidade *in vitro* de *Fop* e *Trichoderma* spp., separadamente, a fungicidas e verificar a compatibilidade entre fungicidas químicos e biológicos para controle de *Fop*, presente nas sementes e no solo. Para avaliar a inibição do crescimento micelial de *Fop*, foram utilizados três isolados do patógeno, os quais foram confrontados, *in vitro*, com três isolados de *Trichoderma* spp. em testes de cultura pareada e produção de metabólitos voláteis a 20-22 °C. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada isolado de *Trichoderma*. Para a classificação da sensibilidade *in vitro* de *Fop* e *Trichoderma* a fungicidas, foram avaliados os mesmos isolados anteriormente utilizados. Foram comparados dez fungicidas, em doses entre 0 a 100 mg L⁻¹ que foram ajustadas de acordo com a CI₅₀ de cada fungicida. Com base na percentagem de inibição do crescimento micelial, foram estimados os valores da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e 100% (CI₁₀₀) e selecionaram-se os fungicidas compatíveis com *Trichoderma* spp. A compatibilidade entre tratamentos químico e biológico foi avaliada através da inoculação artificial de sementes de feijão com um isolado de *Fop* (IAC 11.299-1) e infestação do mesmo no solo. As sementes foram tratadas com os fungicidas fludioxonil, flutriafol e tiofanato metílico, e com os três produtos biológicos, separadamente e em misturas. Avaliou-se o efeito dos tratamentos por meio dos testes de sanidade, germinação, comprimento de plântulas, massa da matéria seca em laboratório e índice de velocidade de emergência e porcentagem de emergência em estufa não climatizada. O efeito protetor dos tratamentos foi verificado através do teste de transmissão do patógeno solo-planta. Todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram antagonismo *in vitro* contra *Fop*. No teste de cultura pareada foi observada uma redução de 15 a 20% no crescimento micelial do patógeno. No teste de produção de metabólitos voláteis, o isolado T12-1086G05 foi responsável pela maior inibição do crescimento micelial de *Fop* (10 a 48%). Os testes de sensibilidade *in vitro* mostraram que tiofanato metílico, flutriafol e fludioxonil foram compatíveis com *Trichoderma* (CI₅₀ > 2 mg L⁻¹). Com exceção do flutriafol e do GF 422 isolados e em mistura, todos os tratamentos foram eficientes na erradicação de *Fop* nas sementes, sem afetar a sua qualidade fisiológica. No teste de transmissão, verificou-se que a incidência de *Fop* foi de 5 a 40% no hipocótilo e de 5 a 30% nas raízes de feijoeiro provenientes de sementes tratadas com os produtos.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; *Trichoderma*; Antagonismo *in vitro*; Fungicidas; Qualidade fisiológica

ABSTRACT

Compatibility between chemical and biological treatments in common bean seeds to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Currently, the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) productivity can be reduced due to the occurrence of diseases in all over the country, especially Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). In the field, the pathogen is spread to long distances through infected and/or contaminated seeds and its survival occurs, mainly, in the soil. The objectives of this work were: to evaluate the micelial growth inhibition of *Fop* promoted by *Trichoderma* spp.; to classificate *in vitro* sensitivity of *Fop* and *Trichoderma* spp., separately, to fungicides and to verify the compatibility between chemical and biological fungicides to control *Fop*, applied on the seeds and on the soil. To evaluate the micelial growth inhibition of *Fop*, it was used three *Fop* isolates, which were *in vitro* confronted with three isolates of *Trichoderma* spp., by paired culture and antibiosis assays at 20-22°C. The experiments were conducted entirely casualized design, with five replications for each *Trichoderma* isolate. For the *in vitro* sensitivity classification, it was evaluated the same isolates of *Fop* and *Trichoderma* previously used. It was compared ten fungicides and the concentrations of 0 to 100 mg L⁻¹, which were adjusted according to the IC₅₀ of each fungicide. Based on the percentage of micelial growth inhibition, it was estimated the values of inhibitory concentration of 50% (IC₅₀) and 100% (IC₁₀₀) and it was selected the compatible fungicides with *Trichoderma* spp. The compatibility between chemical and biological treatments were evaluated through artificial inoculation of common bean seeds with the *Fop* isolate IAC 11.299, following the infestation of the pathogen in the soil. Seeds were treated with fludioxonil, flutriafol and tiofanate methyl, and with three biological products, separately and mixed. It was evaluated the treatment effects by the following assays: sanity, germination, seedling lenght, seedling dry matter in laboratory conditions and emergence speed rate and percentage of emergence in greenhouse conditions. The protective effect of the treatments was verified through the pathogen transmission experiment from soil to plant. All *Trichoderma* isolates showed *in vitro* antagonism against *Fop*. In the paired culture assay it was observed 15 to 20% reduction in the pathogen micelial growth. In the antibiosis assay, the isolate T12-1086G05 was responsible for the maximum micelial inhibition growth of *Fop* (10 to 48%). *In vitro* sensitivity experiments showed that thiofanate methyl, flutriafol and fludioxonil were compatible with *Trichoderma* (IC₅₀ > 2 mg L⁻¹). Except the treatments with fluatrifol and GF 422 alone and in mixture, all the products were efficient in eradicating *Fop* in the seeds, without affect its physiological quality. In the transmission experiment, it was verified that the *Fop* incidence was 5 to 40% in the hypoticol and 5 to 30% in the common bean roots from seed treated with the products.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; *Trichoderma*; *In vitro* antagonism; Fungicides; Physiological quality

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sintomas de amarelecimento e murcha em plantas de feijoeiro causado pelo fungo <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (<i>Fop</i>). Fonte: Campos e Faganello (2015).....	28
Figura 2 - Colonização de <i>Fop</i> em plantas de feijoeiro. Fonte: Loiola (2014).	29
Figura 3 - Crescimento micelial de três isolados de <i>Fop</i> após cinco dias de cultivo pareado com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	49
Figura 4 - Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fop</i> , aos nove dias, em cultivo pareado.....	50
Figura 5 - Inibição do crescimento micelial (%) <i>in vitro</i> de <i>Fop</i> pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial).....	58
Figura 6 - Inibição do crescimento micelial (%) <i>in vitro</i> de <i>Fop</i> pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial).....	59
Figura 7 - Inibição do crescimento micelial (%) <i>in vitro</i> de <i>Fop</i> pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial).....	60
Figura 8 - Sensibilidade de <i>Trichoderma</i> spp. ao fungicida à base fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M.	62
Figura 9 - Sensibilidade de <i>Trichoderma</i> spp. ao fungicida flutriafol.	63
Figura 10 - Inibição do crescimento micelial (%) <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial).....	64
Figura 11 - Inibição do crescimento micelial (%) <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial).....	65
Figura 12 - Inibição do crescimento micelial (%) <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do	

ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial..... 66

Figura 13 - Sementes de feijão inoculadas com *Fop*: testemunha (placa à esquerda) e tratamento biológico com isolado SF 04 (*T. asperellum*) (placa à direita)..... 68

Figura 14 - Sementes de feijão inoculadas com *Fop*: testemunha (placa à esquerda) e tratamento químico com fludioxonil (placa à direita)..... 69

Figura 15 - Sementes de feijão inoculadas com *Fop*: testemunha (placa à esquerda) e tratamento com tiofanato metílico+SF 04 (placa à direita). 70

Figura 16 - Porcentagem de transmissão de *Fop* do solo para o hipocótilo de plantas de feijoeiro aos 25 dias após a semeadura. 78

Figura 17 - Porcentagem de transmissão de *Fop* do solo para a raiz principal de plantas de feijoeiro aos 25 dias após a semeadura. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estádios fenológicos do feijoeiro-comum.	23
Tabela 2 - Produção, área plantada e rendimento nacional por região geográfica nas safras 2013/2014 e 2014/2015.	24
Tabela 3 - Classificação do antagonismo in vitro proposta por Bell et al. (1982).	38
Tabela 4 - Fungicidas registrados para controle de <i>Fusarium</i> spp. avaliados nos ensaios de sensibilidade in vitro de <i>Fop</i> e <i>Trichoderma</i> spp.	40
Tabela 5 - Escala modificada de Edginton et al. (1971) para classificar a eficiência de fungicidas e sensibilidade de fungos a fungicidas.	42
Tabela 6 - Nome comercial dos produtos químicos e biológicos, ingredientes ativos (i.a.), concentração e dose de ingredientes ativos (i.a.) utilizados no tratamento das sementes de feijão para controle de <i>Fop</i>	44
Tabela 7 - Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. através do antagonismo <i>in vitro</i> , conforme escala de Bell et al. (1982)(1), com nove dias de cultivo pareado.	50
Tabela 8 - Efeito de metabólitos voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre o crescimento micelial (%) de <i>Fop</i>	52
Tabela 9 - Equações de regressão, coeficientes de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) e 100% (CI_{100}) do crescimento micelial de <i>Fop</i> em relação aos fungicidas.	55
Tabela 10 - Equações de regressão, coeficientes de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) e 100% (CI_{100}) do crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. em relação aos fungicidas.	61
Tabela 11 - Proposta de uma nova escala para classificar a fungitoxicidade dos fungicidas.	67
Tabela 12 - Efeito dos tratamentos químico e biológico na análise sanitária de sementes de feijão artificialmente inoculadas com <i>Fop</i>	71
Tabela 13 - Porcentagens da primeira contagem, germinação, plântulas anormais e sementes mortas de sementes de feijão 'BRS Estilo' inoculadas artificialmente com <i>Fop</i> e tratadas com produtos químicos e biológicos.	73
Tabela 14 - Comprimento de raiz primária, hipocótilo, comprimento total e massa seca de plântulas oriundas de sementes de feijão 'BRS Estilo'	

inoculadas artificialmente com *Fop* e tratadas com produtos químicos e biológicos..... 74

Tabela 15 - Índice de velocidade de emergência (I. V. E.) e porcentagens de emergência aos oito (E1) e aos dezesseis dias (E2), de plântulas oriundas de sementes de feijão inoculadas artificialmente com <i>Fop</i> e tratadas com produtos químicos e biológicos.....	75
--	----

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum, *Phaseolus vulgaris* L., é uma espécie vegetal cujos grãos compõem uma importante fonte proteica na alimentação humana. Atualmente, o Brasil posiciona-se como o terceiro maior produtor mundial de feijão, com uma produção anual de aproximadamente três milhões de toneladas, superada apenas pela Índia (FAO, 2014).

Embora seja importante para o país, a produtividade desta leguminosa é ainda baixa, devido, principalmente, às doenças. Entre estas, destaca-se uma de etiologia fúngica, conhecida como murcha ou amarelecimento de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder (*Fop*).

No caso das murchas vasculares, o tratamento de sementes é uma opção viável para controlar a doença, pois esta prática tem como objetivos não somente erradicar ou reduzir o inóculo transportado pelas sementes, como também, oferecer uma proteção parcial às sementes e plântulas contra os patógenos presentes no solo.

Atualmente, a adoção de métodos alternativos de controle desempenha um papel importante dentro do manejo integrado de doenças. Nesse contexto, o uso de agentes de biocontrole no tratamento de sementes é uma medida promissora, pois pode ser uma alternativa para diminuir a dependência dos fungicidas nos cultivos agrícolas, e também evitar a resistência dos patógenos a tais produtos químicos. Nesse sentido, o fungo *Trichoderma* spp. destaca-se como importante agente de biocontrole na microbiolização de sementes.

No Brasil, a área tratada com *Trichoderma* spp. cresceu nos últimos anos, e sua viabilidade, como medida de controle de doenças é justificada não só pela sua ação antagonista, mas está relacionada com a sustentabilidade na agricultura moderna (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Considerando-se que são poucos os trabalhos que correlacionam a compatibilidade entre produtos químicos e biológicos, visando, especialmente, o manejo da murcha de fusário, este trabalho tem como objetivos: avaliar a inibição do crescimento micelial de *Fop* por *Trichoderma* spp., através dos testes de cultura pareada e de produção de metabólitos voláteis, classificar a sensibilidade *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Trichoderma* spp., separadamente, aos fungicidas; e

verificar a compatibilidade entre fungicidas químicos e biológicos para controle de *Fop*, presente nas sementes e no solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da cultura do feijoeiro

O gênero *Phaseolus* abrange cerca de 60 espécies, das quais cinco são as mais cultivadas: *P. vulgaris* L. (feijoeiro comum), *P. lunatus* (feijão de lima), *P. coccineus* L. (feijão ayocote), *P. acutifolius* A. Gray (feijão tepari) e *P. polyanthus* Greenman. A espécie de maior relevância econômica é o *Phaseolus vulgaris*, por ser cultivada há mais tempo e a mais utilizada (SINGH, 2001; SANTOS; GAVILANES, 2008).

O feijoeiro-comum é originário do continente americano, possuindo dois centros de origem, o mesoamericano e andino (McCLEAN, 1993). No Brasil, o feijão foi introduzido da América Central e, desde então, os seus grãos compõem, diariamente, uma importante fonte proteica na alimentação. A leguminosa tornou-se um dos pilares da dieta de diversos países, fundamental para a segurança alimentar e nutricional, sobretudo para as classes mais carentes (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

Esta leguminosa caracteriza-se por possuir nutrientes promotores de saúde, como aminoácidos essenciais, fibras, ferro, potássio e magnésio, além de possuir baixo teor de gorduras. Estudos indicam que o seu consumo contribui na redução do risco do desenvolvimento de doenças cardíacas, da obesidade e de vários tipos de câncer (IQBAL et al., 2012).

É uma planta herbácea, anual, autógama, diplóide ($2n=2x=22$ cromossomos), com taxa de fecundação cruzada estimada entre 3% e 5% (BURLE et al., 2010). Pelo fato de ser cultivado em grande diversidade de ambientes e em muitos países, ele é uma das espécies com maior variabilidade de caracteres agrônômicos, como hábito de crescimento, tamanho e cor de grãos e ciclo (SANTOS; GAVILANES, 2008).

O hábito de crescimento é uma característica agrônômica essencial na descrição das cultivares, refletindo na escolha das mais adequadas para o cultivo nas mais variadas condições de cultura e, também, na obtenção de novas cultivares pelo melhoramento (SANTOS; GAVILANES, 2008).

As plantas de feijoeiro podem ser de hábito de crescimento determinado ou indeterminado. As plantas de hábito de crescimento determinado são as que desenvolvem uma inflorescência no ápice da haste principal e das hastes laterais. O

florescimento ocorre do ápice para a base da planta, e dado o seu início, a emissão e a alongação de folhas e ramos são interrompidas. O período de floração é curto e a maturação uniforme (SANTOS; GAVILANES, 2008; COSTA, 2014).

Nas plantas de crescimento indeterminado os meristemas apicais da haste principal e das laterais continuam vegetativos durante o florescimento. Portanto, as plantas continuam a produzir folhas e flores por um período mais longo do que as determinadas. As inflorescências são axilares, isto é, desenvolvem-se nas axilas das folhas, e a floração inicia-se da base para o ápice da planta (COSTA, 2014; SANTOS; GAVILANES, 2006; SILVA, 2014).

As sementes não possuem albume e as reservas nutritivas estão concentradas nos cotilédones. Compõe-se de um tegumento que envolve um embrião bem desenvolvido. Tegumento ou testa corresponde à capa de proteção da semente, onde se localizam os pigmentos. Externamente ao tegumento, há o hilo, micrópila e rafe. Já internamente, está o embrião, o qual é formado pela plúmula, duas folhas primárias, hipocótilo, dois cotilédones e a radícula (VILHORDO, 1988).

A cor do tegumento apresenta ampla variabilidade de cores, podendo ser brilhante, opaca ou apresentar nuances. As diferenças das características externas apresentadas pelos grãos são usadas para classificar os grãos em tipos comerciais: Preto, Mulatinho, Carioca, Roxinho, Rosinha, Amarelo, Manteigão, Branco e outros (COSTA, 2014; SILVA, 2014).

A escala de desenvolvimento usual para a planta de feijão compreende dez estádios (Tabela 1). A identificação de cada estágio é feita com base em um código com uma letra e um número. A letra corresponde a fase à qual o estágio pertence, isto é, V = fase vegetativa e R = fase reprodutiva. Os números de zero a nove indicam, de forma crescente, a posição do estágio na escala (FERNÁNDEZ et al., 1985).

Tabela 1 - Estádios fenológicos do feijoeiro-comum

Estádio ⁽¹⁾	Descrição ⁽²⁾
V0	Germinação
V1	Emergência: os cotilédones aparecem ao nível do solo
V2	Folhas primárias expandidas
V3	Primeira folha trifoliada
V4	Terceira folha trifoliada
R5	Pré-floração: aparecimento do primeiro botão floral e do primeiro rácemo
R6	Floração
R7	Formação das vagens
R8	Enchimento das vagens
R9	Maturação

(1) V = Vegetativa; R = Reprodutiva; (2) Cada estágio começa quando 50% das plantas apresentam as condições relativas ao estágio

Fonte: Adaptado de Fernández et al. (1985)

2.2 Aspectos econômicos da cultura do feijoeiro

Atualmente, o Brasil é responsável por uma das maiores produções de feijão no mundo, posicionando-se como o terceiro maior produtor mundial. O Myanmar ocupa o primeiro lugar com uma produção de 4 milhões de toneladas, e a Índia em segundo, com 3,7 milhões de toneladas (FAO, 2014).

Na safra de 2014/2015, a produção nacional atingiu 3.185,4 milhões de toneladas, concentrando-se, principalmente, no Paraná (23,2%), Minas Gerais (20%), Mato Grosso (10,4%), Goiás (8,3%) e São Paulo (8,3%) (CONAB, 2015). Entre as cultivares utilizadas no país, cerca de 70% correspondem às do grupo Carioca, que é caracterizado pela suscetibilidade às principais doenças e apresenta plantas prostradas (RAMALHO; ABREU, 1998; COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 2010).

O cultivo de feijão no país ocorre em três épocas ou safras, isto é, tem-se o feijão de 1ª época ou “feijão das águas”, cuja semeadura ocorre nos meses de outubro e novembro; o feijão de 2ª época ou “feijão da seca”, semeado nos meses de fevereiro e março; e o feijão de 3ª época ou “feijão de inverno”, semeado em maio e junho (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Esta última surgiu como uma alternativa, simultaneamente com o aparecimento dos sistemas de irrigação via pivô-central no Brasil. As produtividades médias giram em torno de 1.000, 900 e

1.300 kg/ha, respectivamente, para as safras de 1^a, 2^a e 3^a épocas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

A maior parte do feijão produzido no Brasil vem da agricultura familiar, que é responsável por cerca de 60% da produção nacional; por isso o setor não é muito especializado. Os grandes produtores optam por produzir a leguminosa como uma aposta de curto prazo (os três meses entre o plantio e a colheita) em meio a suas atividades principais (COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 2012).

Entretanto, a produtividade da cultura no Brasil permanece abaixo do seu potencial produtivo, o qual é estimado em 6.000 kg/ha (LOBO JUNIOR et al., 2010). Em alguns estados essa média é superior a 1.000 kg/ha (Tabela 2) e os agricultores que utilizam alta tecnologia já ultrapassam a marca de 3.000 kg/ha (BORÉM; CARNEIRO, 2008; CONAB, 2014).

Dessa forma, o intenso cultivo realizado ao longo do ano contribui para o abastecimento interno do grão no país, mas também, por outro lado, propicia uma maior exposição das lavouras a uma série de fatores limitantes, incluindo, por exemplo, as doenças causadas por patógenos do solo.

Entre essas doenças destaca-se a murcha ou amarelecimento de fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder (*Fop*), cujo histórico no país é marcado pela ocorrência em vários estados brasileiros, e que ocasiona prejuízos significativos nas lavouras de feijoeiro.

Tabela 2 - Produção, área plantada e rendimento nacional por região geográfica nas safras 2013/2014 e 2014/2015

Região	Área (mil ha)	Produção (mil t)	Prod. (kg/ha)	Área (mil ha)	Produção (mil t)	Prod. (kg/ha)
	2013/2014			2014/2015		
Sul	665,8	1.056,0	1.586,0	534,6	950,2	1.777,0
Sudeste	488,2	773,2	1.584,0	430,2	706,6	1.642,0
Nordeste	1.642,0	674,1	411,0	1571,0	661,6	421,0
Centro-Oeste	468,0	873,0	1.865,0	401,4	788,7	1.965,0
Norte	101,7	77,5	763,0	97,5	78,3	803,0
Norte/Nordeste	1.743,6	751,6	431,0	1.668,0	740,0	444,0
Centro-Sul	1.622,0	2.702,1	1.666,0	1.366,0	2.445,5	1.790,0
Brasil	3.365,5	3.453,7	1.026,0	3.034,4	3.185,4	1.050,0

Fonte: CONAB (2015)

2.3 Murcha-de-fusário

2.3.1 Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* no mundo e no Brasil

Embora existam poucas informações sobre as perdas ocasionadas por *Fop*, sabe-se que este fungo já foi identificado em vários locais de produção de feijão no mundo (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987, SCHWARTZ; MCMILLAN, 1989; BURUCHARA; CAMACHO, 2000; ALVES-SANTOS et al., 2002).

O primeiro relato sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* foi dado em 1929, em áreas de feijão-comum cultivadas no Vale do Sacramento, na Califórnia. Em 1933, os sintomas da doença reapareceram nas mesmas localidades e, em 1940, causaram perdas de 50% na produção (KENDRICK; SNYDER, 1942). Na Espanha, foi constatada em 1926 e, desde então, tornou-se a principal doença no centro-oeste do país (DÍAZ-MÍNGUEZ et al., 1996; ALVES-SANTOS et al., 1999). Na Costa Rica, o rendimento de grãos foi reduzido em torno de 80% (ECHANDI, 1967) e nos Estados Unidos em 30% (CRAMER et al., 2003).

No caso do Brasil, a primeira ocorrência da murcha de fusário foi no estado de São Paulo, no município de Laranjal Paulista, relatada por Cardoso et al. (1966). Posteriormente, foi diagnosticada em feijoeiro do tipo vagem nos municípios paulistas: Juquiá, Cosmópolis, Campinas, Itariri, Mogi Guaçu e Campinas (Barão Geraldo) (CRUZ et al., 1974). Sintomas típicos da doença também foram relatados por Mohan et al. (1983), em regiões do estado do Paraná. No estado de Minas Gerais a ocorrência da doença foi constatada em 1986, relatada por Zambolim et al. (1987) e Goulart (1988). Durante a década de 90, a doença afetou até 80% das plantas de feijoeiro (SARTORATO; RAVA, 1994).

A murcha de fusário tem sido economicamente importante, principalmente em áreas com o cultivo sucessivo do feijoeiro sob sistemas de irrigação via pivô central e em solos com plantio direto (RAVA et al., 1996; DHINGRA, COELHO NETO, 2001; PAULA JÚNIOR et al., 2004). Em solos do cerrado brasileiro, os tipos de preparo do solo e as culturas que antecederam o cultivo do feijoeiro podem influenciar na incidência da doença. Toledo-Souza et al. (2012) constataram maior incidência de *Fop* em solos com plantio direto, sob cultivos prévios com as espécies leguminosas *Crotalaria spectabilis* e *Cajanus cajan* (feijão-guandu).

Segundo Murillo Lobo Júnior (informação pessoal), a doença pode causar danos em torno de 30%, atualmente, quando ocorre na área total, porém tem ocorrido em áreas mais limitadas.

2.3.2 Etiologia da murcha de fusário

O complexo *Fusarium oxysporum* é o agente causal de doenças vasculares em muitas espécies de plantas, sendo que os isolados que são patogênicos ao mesmo hospedeiro, ou que possuem a mesma amplitude de hospedeiros, são designados *formae speciales*; sabe-se que mais de 70 destas já foram descritas (KISTLER, 1997).

Quando há um alto nível de especialização, *formae speciales* podem ser associadas à patogenicidade em apenas uma espécie hospedeira. Muitas *formae speciales* podem ser subdivididas em raças, tendo-se como base a sua virulência em diferentes cultivares de um hospedeiro (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1981). As raças que causam a murcha ou amarelecimento especificamente na cultura do feijoeiro, recebem a taxonomia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*).

Fusarium oxysporum f. sp. *phaseoli* pertence ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales, família Nectriaceae. O fungo produz três tipos de esporos assexuados, denominados de macroconídios, microconídios e clamidósporos. Os macroconídios são produzidos em fiálides curtas, situados diretamente nas hifas ou ramos finais dos conidióforos, têm forma de canoa, ligeiramente curvos, com três a cinco septos, medindo 3-6 x 25-35 µm. Os microconídios são elípticos, unicelulares de 11 x 3,5 µm ou bicelulares de 18 x 4 µm. Os clamidósporos são hialinos, intercalares ou terminais, medindo 2-4 x 6-15 µm (BIANCHINI et al., 2005).

Até agora sete raças do patógeno já foram descritas baseadas no conjunto de diferenças entre cultivares de feijoeiro. A classificação está relacionada com a origem geográfica, onde foram relatadas raças distintas na Colômbia, Brasil, Itália, Estados Unidos, Grécia e Espanha (RIBEIRO; HAGEDORN, 1979; WOO et al., 1996; ALVES-SANTOS et al., 2002). Raças altamente virulentas podem matar plantas de feijoeiro em até duas semanas (ALVES-SANTOS et al., 2002). No Brasil, foram constatadas quatro raças fisiológicas do fungo (DALLA PRIA; SILVA, 2010).

2.3.3 Epidemiologia da murcha de fusário

A sobrevivência do fungo ocorre, principalmente, no solo, onde vive saprofiticamente em restos de cultura e na matéria orgânica. Em longo prazo, o fungo sobrevive na forma de clamidósporos na ausência do seu hospedeiro (BIANCHINI et al., 2005). Além disso, outras espécies podem se comportar como hospedeiras alternativas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, incluindo *Dolichos lablab* L., *Phaseolus lunatus* L., *Mucuna aterrima*, *Canavalia ensiformes* (L.), *Crotalaria spectabilis*, *Cajanus cajan* (NETTO; DHINGRA, 1999; DHINGRA; COELHO NETO, 2001).

O patógeno é disseminado de um campo para outro, à longa distância, principalmente por sementes infectadas (TOLEDO-SOUZA et al., 2012), ou como esporo aderido à superfície das mesmas (KENDRICK; SNYDER, 1942; MACHADO, 1999; BIANCHINI et al., 2005). A disseminação é facilitada pelo vento e água de irrigação, que carregam conídios e solos infestados a partir de plantas mortas pelo patógeno (BIANCHINI et al., 2005) e por implementos agrícolas contaminados (SARTORATO et al., 1987).

O patógeno é capaz de penetrar nos tecidos radiculares do hospedeiro, como também no hipocótilo e em tecidos radiculares mais velhos, geralmente por ferimentos ou aberturas naturais (DONGO; MÜLLER, 1969; DUQUE; MÜLLER, 1969; ABAWI, 1989). A infecção pode ocorrer em qualquer fase do ciclo da cultura, sob temperatura ótima de 28°C (RIBEIRO; HAGEDORN, 1979). A safra das "secas" é considerada o período crítico de infecção do patógeno, principalmente quando a planta se encontra nos estádios entre V4 (terceira folha trifoliada) e R6 (florescimento) (DALLA PRIA; SILVA, 2010). Os nematóides *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus* spp. são responsáveis pelos ferimentos e aberturas que podem favorecer a entrada do patógeno pelo sistema radicular do feijoeiro (DALLA PRIA; SILVA, 2010; TOLEDO-SOUZA et al., 2008).

Após a penetração, a hifa do fungo é capaz de colonizar inter e intracelularmente a planta, atingindo o seu sistema vascular, especificamente os vasos do xilema (MACE et al., 1981). O fungo permanece confinado nos vasos do xilema até a doença atingir estádios mais avançados de desenvolvimento, levando à morte do hospedeiro. Por fim, o patógeno move-se para outros tecidos e inicia o processo de esporulação na superfície da planta morta (AGRIOS, 2005).

A severidade da doença é maior a 20°C e, em condições de campo, o desenvolvimento do patógeno é favorecido em temperaturas entre 26 a 28°C. Solos arenosos, ácidos, sob condições de estresse hídrico (DALLA PRIA; SILVA, 2010), compactados e com pouca drenagem também podem agravar a severidade da doença (SCHWARTZ et al., 2005).

2.3.4 Sintomatologia da murcha de fusário

Após a penetração do fungo pelo sistema radicular do feijoeiro, cujo processo é facilitado por ferimentos e aberturas naturais, os primeiros sintomas exibidos pela planta são o amarelecimento e a senescência prematura das folhas situadas no terço inferior da planta (SCHWARTZ et al., 2005). Com o progresso da doença, o principal sintoma reflexo é caracterizado pelo amarelecimento das folhas situadas no terço inferior em direção às superiores (Figura 1), geralmente durante a fase de pré-florescimento ou enchimento de grãos (BIANCHINI et al.; 2005). No campo, a doença é comumente confundida com a murcha de *Curtobacterium*, causada pela bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, o que torna difícil a sua diagnose (UESUGI et al., 2003).

Figura 1 - Sintomas de amarelecimento e murcha em plantas de feijoeiro causado pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*)

Fonte: Campos e Faganello (2015)

Plantas jovens, quando infectadas, não apresentam um desenvolvimento normal e, quando adultas, tornam-se raquíticas devido à colonização do sistema vascular da planta. Em casos de infecções mais graves, a planta seca e morre e, sob condições de alta umidade, desenvolvem-se sobre o caule estruturas de

coloração rosada, constituídas de micélio e conídios do patógeno (Figura 2) (BIANCHINI et al., 2005; SCHWARTZ et al., 2005).

Figura 2 - Colonização de Fop em plantas de feijoeiro
Fonte: Loiola (2014)

2.4 Importância da semente no desenvolvimento da doença

A utilização de sementes pelo homem é uma prática universal, empregada para o cultivo de cerca de 90% das espécies vegetais de importância destinadas à alimentação humana e animal (NEERGAARD, 1979).

Na safra de 2013/2014, o uso de sementes certificadas de feijão no Brasil foi de, aproximadamente 20%, um valor muito inferior quando comparado com outras culturas (ANUÁRIO ABRASEM, 2014). Esse fato é justificado pela opção dos produtores em utilizar, como semente, o material oriundo de áreas destinadas para grãos (MENTEN et al., 2007; REY et al., 2009; BARBOSA; GONZAGA, 2012).

O uso de sementes de feijão não certificadas é um dos fatores atribuído às baixas produtividades da cultura no Brasil. A qualidade dessas sementes "salvas" pelos produtores se caracteriza, de maneira geral, por apresentar baixa pureza, alto grau de umidade, baixa germinação e vigor, infestação por insetos e, principalmente, pela presença de patógenos associados a elas (ZAMBOLIM, 2005; MENTEN et al., 2007).

Dentre as doenças de importância econômica para a cultura do feijoeiro, cerca de 50% são disseminadas pelas sementes (NEERGAARD, 1979; FREITAS, 2007) e são responsáveis por perdas significativas na produção (ITO et al., 2003, MENTEN et al., 2007). Os fungos que representam este quadro são: *Alternaria* spp., *Colletotrichum lindemuthianum*, *Pseudocercospora griseola*, *Fusarium oxysporum* f.

sp. phaseoli, *Fusarium solani* f. *sp. phaseoli*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e outros (ITO et al., 2003).

No caso da murcha de fusário, a semente de feijão é a principal fonte de inóculo e esta pode veicular o patógeno externamente, na forma de esporos aderidos à superfície do tegumento, ou internamente, como micélio dormente (MACE et al., 1981; VIEIRA, 1993).

Já foi constatado que as estruturas do patógeno presentes nas sementes permaneceram viáveis durante o período de armazenamento superior a oito meses (VILELA et al., 2010) e podem constituir o inóculo primário para o desenvolvimento de epidemias na cultura do feijoeiro (SILVA et al., 2008).

Diante disso, a detecção do fungo em sementes e a determinação da taxa de transmissão são informações importantes visando o estabelecimento de medidas de manejo da doença.

A Portaria n° 3 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, de 5 de janeiro de 2004, propôs nível de tolerância zero para algumas Pragas Não Quarentenárias Regulamentadas (PNQR); dentre elas está incluído o agente causal da murcha de fusário, em todas as classes de sementes (BRASIL, 2004).

Em amostras de sementes de feijão produzidas no estado de Goiás, Silva et al. (2008) detectaram a presença de *Fusarium* spp. em oito cultivares de feijoeiro, a níveis de 7 e 8% nas cultivares Pérola e Corrente, respectivamente. Os autores, ainda, destacaram a importância das sementes contaminadas e/ou infectadas em veicular patógenos como *Fusarium oxysporum* f. *sp. phaseoli*, *Fusarium solani* f. *sp. phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Menten et al. (2007) verificaram que, entre 299 amostras de feijão analisadas entre os anos de 2000 a 2005, no estado de São Paulo, 4,0% eram portadoras de *Fusarium oxysporum* f. *sp. phaseoli*, cuja média de incidência nas sementes portadoras foi de 0,2% e máxima de 0,5%.

É importante ressaltar que a baixa incidência de patógenos em um lote de sementes pode causar uma falsa impressão de boa qualidade fitossanitária destas. No entanto, considerando-se a presença de 0,5% de sementes infectadas por um patógeno, grandes epidemias podem ser causadas a partir deste inóculo primário. Nessa situação, um estande de 250.000 plantas de feijoeiro por hectare, poderia haver, já no início da lavoura, uma proporção de 1.250 focos de doença por hectare (LOBO JUNIOR et al., 2010).

Em sementes de feijão macassar (*Vigna unguiculata*), o índice de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* variou de 0,5% (BARROS; MENEZES, 1980) a 46,7% (BARROS et al., 1985).

Sob o ponto de vista fitopatológico, a importância da associação patógeno - semente não reside apenas no fato de ser mais um processo de disseminação, mas, também, por se constituir em um meio de sobrevivência do patógeno em contato direto com o hospedeiro, implicando em consequências diretas, tais como a introdução da doença em áreas indenizadas. Além disso, a incidência de doenças já existentes em uma área tende a aumentar com a frequente introdução de patógenos pelas sementes (MENTEN, 1995; SANTOS et al., 1996; FREITAS, 2007; MENTEN et al., 2007).

2.5 Manejo da murcha de fusário

Para o controle da murcha de fusário é importante impedir a introdução do patógeno em áreas indenizadas, pois uma vez detectada a presença no campo, a erradicação do inóculo torna-se muito difícil através de práticas culturais e controle químico (SARTORATO; RAVA, 1994).

Atualmente, a doença tem sido um problema, pois a sua ocorrência está relacionada com a sua introdução em novas áreas de cultivo de feijoeiro, em decorrência da utilização de grãos portadores de *F. oxysporum* (PEREIRA; YOKOHAMA; 1999) e pelo cultivo intenso de feijoeiro nas mesmas áreas infectadas com o patógeno (RAVA et al., 1996; PAULA JÚNIOR et al., 2004b). Estas circunstâncias obrigam, de certa forma, os produtores a conviver com a doença.

Embora o uso de cultivares resistentes seja a opção mais eficiente para controlar a doença, muitos produtores ainda optam por utilizar cultivares suscetíveis, devido às características agrônomicas desejáveis e pela preferência do mercado consumidor (TOLEDO-SOUZA et al., 2012).

Desse modo, a análise da qualidade sanitária das sementes, em conjunto com o tratamento das mesmas, consiste em medidas preventivas fundamentais visando o manejo da doença (COSTA et al., 2003).

Considerando-se o manejo integrado de doenças, o tratamento de sementes constitui um método eficaz na sua prevenção, seja por meio de fungicidas ou do uso de agentes biológicos. Esta prática tem como objetivos não somente erradicar ou

reduzir o inóculo transportado pelas sementes, como também proporcionar uma proteção parcial às sementes contra patógenos, ou então, presentes no solo (AZEVEDO, 1996; SARTORATO, 1996; GOULART, 2005, REIS et al., 2010).

Dentre os benefícios oferecidos pelo tratamento de sementes, destacam-se o baixo custo (ITO et al., 2003; HENNING, 2005) e a garantia do estabelecimento das culturas, pois oferece proteção contra fungos de solo durante os períodos de pré e pós emergência das plantas (HENNING et al., 1994; SARTORI et al., 2004).

2.5.1 Controle químico de *Fop* associado à semente

Para a cultura do feijoeiro, o tratamento químico de sementes é uma medida muito utilizada pelos agricultores para o manejo de diversos fungos. Além de atuarem como protetores, os fungicidas aplicados nas sementes, impedem, principalmente, a penetração dos fungos infectantes de raízes e os aderidos à semente na superfície desta, evitando assim, a colonização dos órgãos aéreos ou radiculares (REIS et al., 2010).

A eficiência do fungicida está, muitas vezes, relacionada com informações quanto ao seu espectro de ação, toxicologia, efeitos fitotóxicos e compatibilidade com outros produtos (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977).

Atualmente, visando o controle de *Fop*, o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT, 2015), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, apresenta o fungicida Captan SC (captana) e o fungicida-inseticida Cruiser Advanced (metalaxil-M, fludioxonil, tiabendazol e tiametoxam).

No geral, na literatura há relatos que comprovam a eficiência de outros ingredientes ativos no tratamento de sementes de feijão. Em condições de casa de vegetação, sintomas de escurecimento nas raízes de feijoeiro foram observados por Pandolfo (2007), cujas sementes haviam sido inoculadas com *Fop*. O tratamento das sementes com carboxim + tiram e carbendazim + tiram, nas doses recomendadas pelo fabricante para outros patógenos, foram os mais eficazes em controlar *Fop*.

No entanto, em alguns locais como a Colômbia e a região Andina, a murcha de fusário tem sido um grande problema fitossanitário, pois o manejo convencional, exclusivamente com a aplicação de fungicidas, tem se mostrado ineficiente no controle desta doença (AVENDÃÑO et al., 2006). Deste modo, para prevenir a ocorrência deste problema no país, é importante realizar estudos que viabilizem

alternativas de manejo, como o controle biológico, ou até mesmo validar o uso de agentes biológicos com fungicidas.

2.5.2 Controle biológico

O gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*) é um fungo pertencente à classe *Hyphomycetes*, ordem *Hyphomycetales*, família *Moniliaceae* (HARMAN, 2000). Pelo fato de muitas linhagens não apresentarem o ciclo sexual conhecido (HARMAN et al., 2004), estes microrganismos são classificados como fungos anamórficos ou imperfeitos. Os fungos imperfeitos são caracterizados pela produção de conídios formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas (conidiomas), ou por fragmentação do talo micelial (MASSOLA JR; KRUGNER; 2011).

No ambiente, *Trichoderma* spp. costumam ser microrganismos de vida livre, que interagem no solo, nas superfícies radiculares e no interior dos tecidos vegetais (RAJENDIRAN et al., 2010). Esses fungos também colonizam outros substratos, como a madeira, onde a fase sexual (gênero *Hypocrea*) é frequentemente encontrada.

Na agricultura, esta classe de fungos tem despertado um interesse cada vez mais expressivo, especialmente com relação ao seu uso como agentes de biocontrole de doenças de plantas. Desde então, pesquisas têm elucidado os mecanismos que estes fungos desenvolvem, configurando-os assim, como verdadeiros antagonistas de fitopatógenos. Os mecanismos mais conhecidos são: competição por nutrientes, antibiose, micoparasitismo, competência rizosférica e indução de resistência (PAPAVIZAS, 1985; MELO, 1991; MARTINS-CORDER; MELO, 1998; HARMAN, 2000; HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004). Por apresentarem uma velocidade de crescimento alta, são capazes de se estabelecer no solo rapidamente e controlar diversos patógenos, sobretudo aqueles habitantes de solo, como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. (MELO, 1998).

No Brasil, a área tratada com *Trichoderma* spp. cresceu nos últimos anos, e sua viabilidade, como medida de controle de doenças, está relacionada com a prática da microbiolização. Esse método é definido como a aplicação de

microrganismos vivos às sementes para o controle de fitopatógenos e/ou promoção do crescimento de plantas (MELO, 1996).

Nesse sentido, para a cultura do feijoeiro, há apenas dois produtos à base de *Trichoderma* spp., registrados no Brasil, para o controle de *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*, representados pelas espécies de *T. asperellum* e *T. harzianum* (AGROFIT, 2015). No entanto, de acordo com Lopes (2009), existe no mercado um grande número de produtos que não possuem registro junto ao MAPA, porém são utilizados no tratamento de substrato e de sementes e pulverização na parte aérea das plantas.

Em trabalho realizado por Lohmann et al. (2007), isolados de *Trichoderma* spp. reduziram em, aproximadamente, 73% o tombamento de plântulas causado pelo fungo *Sclerotium rolfsii* em plântulas de soja, em comparação à testemunha. Menezes et al. (2004) também verificaram o bom desempenho de *Trichoderma harzianum* através da aplicação do antagonista em sementes de feijão, visando o controle de *Macrophomina phaseolina* inoculado no solo. Para o controle da podridão radicular seca (PRS) do feijoeiro, os produtos comerciais Trichodermil SC, Trichodermax CE e Trichodel Solo SC, usados no tratamento de sementes ou aplicados no sulco de plantio, aumentaram a emergência das plântulas tanto quanto o fungicida fludioxonil. A incidência de PRS não foi afetada, mas todos os produtos biológicos e o químico reduziram a severidade em relação à testemunha (TEIXEIRA et al., 2012).

Para o patossistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e feijoeiro, existem alguns trabalhos na literatura que relatam o uso de diferentes espécies de *Trichoderma* no controle da murcha de fusário.

Ao avaliar o potencial de 41 isolados de *Trichoderma* spp., aplicados na forma de pó biológico em solo natural, REIS et al. (1995) observaram que os isolados TN-31 (*Trichoderma aureoviride*), TN 63 (*T. viride*) e TN-10 reduziram em até 55% a severidade da murcha de fusário do feijoeiro, apresentando-se mais eficientes que o fungicida benomyl no tratamento de sementes.

Em estudo com a espécie *Trichoderma harzianum*, CARVALHO et al. (2011) constataram que seis isolados apresentaram antagonismo *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, sendo que os isolados CEN202, CEN234, CEN238 e CEN240 reduziram entre 35 e 51% a incidência do patógeno em sementes de feijão

artificialmente inoculadas, e proporcionaram uma média entre 73 e 81% de plântulas normais.

2.5.3 Combinação entre produtos químicos e biológicos no tratamento de sementes

A substituição de um produto químico por um biológico não é a situação adequada, mas, é sim, incentivar a adoção de sistemas de cultivo mais sustentáveis e, portanto, menos dependente do uso de defensivos químicos (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Uma vantagem da interação de um fungicida com um antagonista parece ser o controle inicial de patógenos pelo fungicida e a habilidade do antagonista de desenvolver e persistir nas raízes, reduzindo a infecção dos patógenos durante o desenvolvimento de plantas (LUZ, 2003). Neste âmbito, Lobo Júnior et al. (2009) relatam que, após o fim do efeito residual do fungicida nas sementes, o *T. harzianum* é capaz de prolongar a proteção nas raízes, gerando plantas com maior volume radicular. Os autores comprovaram que a combinação do fungicida fludioxonil + *T. harzianum* "1306" (formulação em pó molhável) controlou *F. solani* e *R. solani* nas raízes de feijoeiro, resultando em um ganho de 400 quilos na produtividade em relação ao fungicida sozinho.

Na agricultura, o sucesso da utilização de espécies de *Trichoderma*, uma vez associados aos fungicidas, requer estudos que comprovem a compatibilidade entre esses produtos utilizados e, se possível, estabeleçam as concentrações adequadas para cada caso (MELLO et al., 2003). Esta ideia é reforçada por Lucon (2008), ao sugerir que isolados de *Trichoderma* spp. podem ser aplicados separadamente ou em combinação com outros antagonistas ou, ainda, com fungicidas comumente empregados no controle de fitopatógenos de solo.

No controle de doenças na cultura do trigo, os tratamentos com bioprotetor *Paenibacillus macerans* (isolado Embrapa 144) e/ou o fungicida difenoconazole reduziram significativamente os patógenos presentes nas sementes (*Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis* e *Aspergillus* spp.), *in vitro*, com destaque às combinações de ambos, que reduziram drasticamente ou erradicaram os patógenos (LUZ, 2003).

A combinação do fungicida dimetilditiocarbamato e do produto biológico Agrotich® (*Trichoderma* spp.), com a metade da dose recomendada pelo fabricante, dos dois produtos, proporcionou efeito positivo no potencial fisiológico e sanitário de sementes de soja, pois houve o controle dos fungos *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp (BRAND et al., 2009).

Em condições de laboratório, os isolados selvagens de *T. harzianum* e *T. viride* mostraram-se sensíveis aos fungicidas benomil e iprodione. O fungicida benomyl, na concentração de 2,5 µg/ml, inibiu em 70% o crescimento micelial dos agentes biológicos, e o iprodione reduziu em quase 100% o crescimento de todos os isolados a partir de 100 µg/ml (SILVA et al., 1999).

Além dos produtos biológicos, existem trabalhos que avaliaram a compatibilidade de fungicidas com outros produtos para a cultura do feijoeiro. Navarini et al. (2009), ao testarem a compatibilidade do acibenzolar-S-methyl com fungicidas, verificaram que as melhores respostas foram obtidas quando indutor e fungicidas foram combinados. Para o controle da antracnose, por exemplo, foram observadas reduções médias de, respectivamente, 66 e 51% na severidade da doença em relação à aplicação isolada do indutor e fungicidas

Ao avaliarem a compatibilidade entre a inoculação de rizóbios e fungicidas aplicados em sementes de feijoeiro-comum, Kintschev et al. (2014) observaram que os ingredientes ativos fipronil + tiofanato metílico + piraclostrobina, fludioxonil + metalaxil-M + tiabendazol e fludioxonil + metalaxil-M não afetaram a produtividade do feijoeiro, embora tenha afetado a nodulação (matéria seca de nódulos) das plantas.

Considerando o patossistema do presente trabalho, o qual possui somente dois fungicidas recomendados para o tratamento de sementes, estudos que comprovam a compatibilidade do uso de produtos à base de *Trichoderma* spp. com produtos químicos, podem ser úteis para o manejo integrado da murcha de fusário.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes e na estufa não climatizada, localizados no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

3.1 Obtenção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Os três isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* empregados neste trabalho são provenientes do Instituto Agronômico de Campinas (isolado 11.299-1) e de plantas com sintomas de escurecimento na raiz e amarelecimento nas folhas, coletadas nos municípios de Capão Bonito e Avaré, estado de São Paulo.

Para a obtenção dos isolados provenientes de plantas sintomáticas, pequenos fragmentos da raiz e do colo foram lavados em água corrente, imersos em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e lavados em água destilada e esterilizada. Os fragmentos das plantas foram depositados em caixas do tipo Gerbox, contendo substrato de papel de filtro umedecido. Após 48 horas de incubação, sob fotoperíodo alternado de 12 horas de luz e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, porções de micélio do fungo foram retirados e transferidos para placas de Petri 90 X 15 mm contendo meio de cultura BDA, obtendo-se colônias puras do patógeno. A confirmação da identificação do patógeno como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, foi realizada através da observação de lâminas no microscópio óptico. Os isolados provenientes de Capão Bonito e Avaré foram então denominados, respectivamente, de Fus-CB e Fus-AV.

A patogenicidade dos isolados foi confirmada com a inoculação destes em sementes de feijão cultivar 'IAC Alvorada' através do método de COSTA et al. (2003). As sementes permaneceram em contato com os isolados durante 48 horas e foram incubadas sob fotoperíodo alternado de 12 horas de luz e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, as sementes foram semeadas em caixas de plástico contendo substrato comercial Basaplan. Verificaram-se os sintomas típicos da murcha de fusário nas plantas de feijoeiro aos 25 dias após a semeadura.

Todos os isolados obtidos foram preservados em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA e óleo mineral esterilizado e pelo método de Castellani, até a realização dos experimentos.

3.2 Produtos à base de *Trichoderma* spp.

Foram utilizados três isolados comerciais de *Trichoderma* spp., sendo dois deles *T. asperellum*, cedidos pela empresa Grupo Farroupilha Ltda (Produtos à base dos isolados SF 04 e GF 422), e o outro produto, a base de *T. harzianum*, cedido pela Koppert Brasil (T12-1086G05).

3.3 Teste de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. em cultura pareada

Para verificação do antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Fop*, foi utilizada a adaptação do método de cultura pareada (DENNIS & WEBSTER, 1971b) e a classificação do antagonismo, de acordo com a escala descrita por Bell et al. (1982). Discos de 5 mm de diâmetro retirados da borda de colônias de *Fop*, com cinco dias de cultivo, foram transferidos para um lado da placa de Petri contendo BDA e, decorridos três dias, foi posicionado, opostamente em cada placa, um disco de cultura do antagonista. As placas foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Aos cinco dias após repicagem dos isolados do antagonista, foram realizadas medições do diâmetro das colônias do patógeno e, aos nove dias, a classificação do antagonismo (BELL et al., 1982), que consiste na escala com notas de 1 a 5 (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação do antagonismo *in vitro* proposta por Bell et al. (1982)

Classificação	Descrição
Classe 1	Antagonista cresce sobre <i>Fop</i> e ocupa toda a superfície do meio
Classe 2	Antagonista cresce, sobrepondo-se sobre a colônia do patógeno (2/3 da placa)
Classe 3	Antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa (sem sobreposição)
Classe 4	<i>Fop</i> cresce sobrepondo-se sobre a colônia do antagonista (2/3 da placa)
Classe 5	Antagonista não cresce e <i>Fop</i> ocupa toda a superfície da placa.

O experimento foi conduzido duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada isolado de *Trichoderma* e de *Fop*. Os

dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico Assistat versão beta 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

3.4 Teste de produção de metabólitos voláteis

Após três dias de crescimento de *Fop* em BDA a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, foi colocado um disco de micélio dos antagonistas no centro de placas de Petri contendo meio BDA solidificado. As bases das placas contendo o antagonista recém colocado e o patógeno foram sobrepostas e unidas com filme plástico transparente, conforme metodologia de Dennis e Webster (1971a). As placas foram mantidas nas condições mencionadas, de forma que as bases superiores continham o patógeno. Quando a colônia testemunha (base sem antagonista) atingiu a borda da placa, foi medido o diâmetro das colônias de *Fop*.

Os valores médios de percentagens de inibição pelos metabólitos voláteis (mv) foram obtidos em relação ao crescimento da testemunha. Considera-se 100% de crescimento a área final ocupada pela testemunha menos a área inicial (patógeno com três dias de crescimento).

O experimento foi conduzido duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada isolado de *Trichoderma* e de *Fop*. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico Assistat versão beta 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

3.5 Sensibilidade *in vitro* de *Fop* e de *Trichoderma* spp. a fungicidas

3.5.1 Interferência *in vitro* de fungicidas no crescimento de *Fop*

Foi avaliado o efeito de fungicidas sobre o crescimento de isolados de *Fop*, através do método da incorporação do fungicida no meio de cultura fundente. Os fungicidas utilizados foram selecionados com base nos ingredientes ativos registrados para controle de *Fusarium* spp. na cultura do feijoeiro (AGROFIT, 2015). Assim, foram avaliados dez fungicidas, listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Fungicidas registrados para controle de *Fusarium* spp. avaliados nos ensaios de sensibilidade in vitro de *Fop* e *Trichoderma* spp

Ingrediente ativo (i.a.)	Nome comercial	Grupo químico	Concentração i.a. (g.L⁻¹)	Classe toxicológica	Classe ambiental
Captana	Captan SC	Dicarboximida	480	I - Extremamente tóxico	III- Perigoso
Carbendazim	Derosal 500 SC	Benzimidazol	500	II- Altamente tóxico	III- Perigoso
Fludioxonil + Tiabendazol + Metalaxil M+ Tiametoxam	Cruiser Advanced	Fenilpirrol, benzimidazol, acilalaninato e neonicotinóide	25+150+20+350	I - Extremamente tóxico	II- Muito perigoso
Difecononazol	Spectro	Triazol	150	I - Extremamente tóxico	II- Muito perigoso
Fludioxonil	Maxim	Fenilpirrol	25	IV - Pouco tóxico	II- Muito perigoso
Flutriafol	Vincit 50 SC	Triazol	50	III - Medianamente tóxico	III- Perigoso
Metalaxil-M	Apron 350	Acilalaninato	350	I - Extremamente tóxico	II- Muito perigoso
Tiabendazol	Tecto SC	Benzimidazol	485	III - Medianamente tóxico	II- Muito perigoso
Tiram	Rhodiaurum SC	Dimetilcarbamato	500	III - Medianamente tóxico	II - Muito perigoso
Tiofanato metílico	Cercobin 700 WP	Benzimidazol	700	I- Extremamente tóxico	II - Muito perigoso

Primeiramente, foram preparadas as diluições dos fungicidas em água destilada e esterilizada, de acordo com a metodologia descrita por Camargo (2013). Calculou-se a quantidade de produto comercial necessária para a obtenção de uma suspensão estoque de 10.000 mg L^{-1} de ingrediente ativo. A partir desta, foram preparadas as diluições seriadas, obtendo-se as suspensões com as concentrações de 1000, 100, 10, 1 e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. No caso do fungicida a base de fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M+tiametoxam, foram considerados somente as concentrações de ingredientes ativos dos fungicidas, excluindo a concentração do inseticida.

O meio de cultura BDA foi autoclavado e, ainda em estado fundente (60°C), as suspensões foram adicionadas de modo que as concentrações finais dos produtos foram estabelecidas considerando o volume do meio utilizado. Inicialmente, as concentrações utilizadas foram 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 25; 50 e 100 mg L^{-1} . Após, as doses foram ajustadas conforme a CI_{50} de cada fungicida. Nesta etapa, as doses utilizadas foram: 0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1 mg L^{-1} para fludioxonil e carbendazim; 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 5 mg L^{-1} para difenoconazol e fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M; 0; 0,75; 1; 2,5 e 5 para tiofanato metílico e tiabendazol; 0; 1; 5; 10; 25 e 50 mg L^{-1} para flutriafol e 0, 10, 25, 50 e 100 para tiram, captana e metalaxil-M.

Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri 90 X 15 mm, preparando-se cinco placas por tratamento. Após 24 horas, as placas de Petri contendo o meio de cultura receberam um disco de micélio de 5 mm de diâmetro de *Fop* no centro (CARVALHO et al., 2011). Foram avaliados os três isolados de *Fop*. As placas foram incubadas em câmara de crescimento, com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento micelial dos antagonistas foi feita após a testemunha atingir um dos bordos da placa, medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos ortogonais, com o auxílio de um paquímetro digital.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, onde cada parcela foi representada por uma placa de Petri.

A partir dos dados obtidos, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos tratamentos, em relação à testemunha, e os resultados foram submetidos à análise de regressão pelo programa Infostat e Excel. Através

das equações de regressão, foram estimados os valores de CI_{50} e CI_{100} de cada fungicida. Os índices de CI_{50} e CI_{100} indicam, respectivamente, as concentrações de ingrediente ativo capaz de inibir 50% e 100% do crescimento micelial do fungo. A sensibilidade dos isolados aos fungicidas foi classificada de acordo com os critérios de Edgington et al. (1971) modificado (Tabela 5), com as seguintes escalas:

Tabela 5 - Escala modificada de Edgington et al. (1971) para classificar a eficiência de fungicidas e sensibilidade de fungos a fungicidas

CI_{50}	Eficiência	Sensibilidade
<1	Altamente eficiente	Altamente sensível
1-10	Moderadamente eficiente	Moderadamente sensível
10-50	Pouco eficiente	Pouco sensível
>50	Ineficiente	Insensível

3.5.2 Sensibilidade *in vitro* de *Trichoderma* spp. a fungicidas

Para a avaliação da sensibilidade de *Trichoderma* spp. a fungicidas, foi utilizado também o método da incorporação do fungicida no meio de cultura fundente. Os fungicidas avaliados foram escolhidos com base no mesmo critério utilizado para a realização da etapa anterior, assim como as concentrações avaliadas.

Os procedimentos de preparo das diluições e incorporação dos fungicidas no meio de cultura foram executados conforme descritos na etapa 3.5.1. As concentrações iniciais utilizadas foram: 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 10, 25, 50 e 100 mg L⁻¹. Após as doses foram ajustadas conforme a CI_{50} de cada fungicida e o experimento foi repetido. Assim, as doses utilizadas foram: 0, 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ para carbendazim e difenoconazol; 0, 0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5 mg L⁻¹ para fludioxonil; 0, 0,5; 1, 2,5, 5 e 7,5 para fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M e tiabendazol; 0, 7,5, 10, 25, 50 e 100 mg L⁻¹ para flutriafol; 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 25 e 50 mg L⁻¹ para tiofanato metílico; e 0, 10, 25, 50 e 100 mg L⁻¹ para metalaxil-M, tiram e captana. Desse modo, após 24 horas de repouso das placas de Petri contendo BDA, foi colocado ao seu centro um disco de micélio de 5 mm de diâmetro de *Trichoderma*, obtido a partir de colônias com 7 dias (CARVALHO et al., 2011). As placas foram incubadas em câmara de crescimento, com temperatura de 20 ±2°C e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento micelial dos antagonistas foi feita após a testemunha atingir um dos bordos da placa, medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos ortogonais, com o auxílio de um paquímetro digital.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada conforme descrito no item 3.5., obtendo-se os valores de CI_{50} e CI_{100} .

3.6 Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico em sementes de feijão artificialmente inoculadas com *Fop*

3.6.1 Obtenção de sementes artificialmente inoculadas com *Fop*

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar BRS Estilo sabidamente sadias e suscetíveis a *Fop* foram inoculadas com o isolado Fus- IAC 11.299-1. Foi utilizada a técnica da restrição hídrica do meio de cultura BDA + Manitol a -1,0 MPa, como descrito por Costa et al. (2003).

Após sete dias de cultivo do isolado em placas de Petri contendo o meio de cultura e, constatada a colonização total da superfície, as sementes foram colocadas em contato com o fungo. Essas sementes foram previamente submetidas à assepsia superficial (3 minutos com hipoclorito de sódio a 1%), e posteriormente à secagem por dois dias em superfície asséptica.

Posteriormente, as sementes permaneceram durante seis horas em contato com as colônias de *Fop*. Após este período, as sementes permaneceram no laboratório em recipientes assépticos para secagem durante dois dias. Foi realizada uma mistura das sementes, em uma proporção de uma parte de sementes inoculadas para duas partes de sementes sadias. Esta mistura foi feita no momento que as sementes estavam para ser tratadas com os produtos químicos e biológicos.

3.6.2 Tratamento das sementes

Após a obtenção das sementes artificialmente inoculadas com *Fop*, estas foram submetidas a tratamentos com os produtos biológicos à base de *Trichoderma* spp. e com os fungicidas fludioxonil, flutriafol e tiofanato metílico. As sementes foram tratadas de acordo com as recomendações dos fabricantes, em uma calda única, com a aplicação das doses apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Nome comercial dos produtos químicos e biológicos, ingredientes ativos (i.a.), concentração e dose de ingredientes ativos (i.a.) utilizados no tratamento das sementes de feijão para controle de *Fop*

Produto Comerciais	Ingredientes ativos	Concentração do i. a. (g.L⁻¹)	Dose do p.c.⁽¹⁾/ kg de sementes
Maxim	Fludioxonil	25	2 mL
Vincit 50 SC	Flutriafol	50	1mL
Cercobin 700 WG	Tiofanato metílico	700	1 grama
SF 04	<i>T. asperellum</i>	1x10 ¹⁰ ufc/g	1 grama
GF 422	<i>T. asperellum</i>	1x10 ¹⁰ ufc/g	1 grama
T12-1086G05	<i>T. harzianum</i>	4x10 ⁹ conídios viáveis /mL	2 mL

(1) p.c.: produto comercial

Os tratamentos incluíram duas testemunhas, sendo uma representada por sementes sadias e a outra representada por sementes inoculadas com *Fop*, misturadas com sementes sadias. De acordo com a dose recomendada pelo fabricante, os tratamentos utilizados foram: fungicidas isolados, produtos biológicos isolados e combinação de produtos químicos e biológicos.

Para o tratamento das sementes somente com os produtos biológicos, a quantidade de produto recomendada pelo fabricante foi pesada e, em seguida, diluída em água na proporção de 0,8 mL de água para 100 gramas de sementes.

Para os tratamentos envolvendo os produtos biológicos e químicos misturados, o procedimento consistiu em diluir os produtos na dosagem recomendada pelo fabricante na mesma proporção de 0,8 mL de água para 100 gramas de sementes.

As sementes receberam os produtos dentro de um saco plástico, agitando-as manualmente até ocorrer à homogeneização da formulação sobre as sementes.

3.6.3 Testes em laboratório e em estufa

Imediatamente após o tratamento, as sementes foram submetidas aos seguintes testes:

Teste de sanidade - Foi realizado através do método de papel filtro, conforme o Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009a), utilizando-se quatro repetições de 50 sementes dispostas individualmente em placas de Petri,

sobre três discos de papel de filtro umedecido com água destilada, distanciadas 1-2 cm uma das outras. Posteriormente, as sementes foram mantidas em câmara de incubação, à temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em regime alternado de 12 horas de luz fluorescente branca e 12 horas de escuro, por um período de sete dias. Para detecção dos fungos, as sementes foram examinadas individualmente, com o auxílio de um estereomicroscópio, à resolução de 30-80X. A confirmação da espécie foi feita mediante confecção de lâminas microscópicas e análise destas sob aumento de até 400X no microscópio óptico.

Teste de germinação - Foram utilizadas quatro repetições com 50 sementes cada, em substrato de papel toalha em forma de rolo, umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel, e acondicionadas em germinador à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após cinco dias de incubação, foi realizada a primeira contagem de germinação, computando-se o número de plântulas normais, com os resultados expressos em percentagem. Após nove dias, foi realizada a contagem final de germinação, determinando-se a percentagem de plântulas normais, de plântulas anormais e de sementes mortas, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009b).

Comprimento de plântulas- Foram utilizadas quatro repetições de dez sementes por tratamento. Uma linha foi traçada no terço superior do papel toalha de germinação no sentido longitudinal. Os papéis foram umedecidos previamente com água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel (NAKAGAWA, 1999). As sementes foram posicionadas de forma que a micrópila estivesse voltada para a parte inferior do papel. Os rolos foram posicionados verticalmente no germinador por cinco dias a 25°C . Ao final deste período, foi efetuada a medida das partes das plântulas normais emergidas, utilizando-se uma régua. As médias dos comprimentos de raiz primária, hipocótilo e total das plântulas foram expressas em centímetros.

Massa da matéria seca- As plântulas consideradas normais no teste de comprimento de plântulas foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa, com temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. Os resultados foram obtidos dividindo-se cada peso pelo número de plântulas normais (NAKAGAWA, 1999). A pesagem foi realizada em balança de precisão e as médias de cada tratamento expressas em gramas.

Para as avaliações em estufa, foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, semeadas em caixas de plástico, contendo o substrato comercial Basaplan®. A partir disso, foram realizados os testes para a obtenção dos seguintes dados:

Índice de velocidade de emergência (IVE) - Diariamente, foi feita a contagem do número de plântulas emergidas, considerando-se as que apresentavam o cotilédone acima da superfície do solo, até que o processo se estabilizasse. O cálculo do IVE foi baseado na fórmula de Maguire (1962), na qual $IVE = N1/D1 + N2/D2 + \dots + Nn/Dn$, onde: IVE = índice de velocidade de emergência de plântulas; N= número de plântulas emergidas e computadas da primeira à última contagem; D = número de dias da semeadura da primeira a última contagem.

Porcentagem de emergência - Considerou-se a contagem de plântulas emergidas aos 8 e aos 16 dias após a semeadura, sendo o valor absoluto transformado em porcentagem.

3.6.4 Análises Estatísticas

Os delineamentos experimentais foram inteiramente aleatorizados, para os testes realizados em laboratório, e em blocos inteiramente casualizados para os testes em estufa.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico Assistat versão beta 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

3.7 Determinação da taxa de transmissão de *Fop* a partir do substrato infestado

O experimento foi conduzido na estufa localizada no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, em Piracicaba, SP (22° 42' S; 47° 38' W) a 546 metros de altitude. De acordo com o posto meteorológico de Piracicaba (ESALQ/USP), durante o período as temperaturas médias do ar foram, respectivamente, 20,9°C; 23,6°C e 25,4°C, nos meses de agosto, setembro e outubro de 2015.

3.7.1 Preparo do inóculo

Para esta etapa do projeto, foi utilizado o isolado de *F. oxysporum* IAC 11.299-1, anteriormente preservado em meio de cultura BDA. Discos de 5 mm de diâmetro foram colocados ao centro das placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas à $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em regime alternado de 12 horas de luz fluorescente branca e 12 horas de escuro, por um período de 10 dias.

3.7.2 Tratamento das sementes

As sementes de feijão cultivar 'BRS Estilo', com germinação de 85%, foram tratadas conforme descrito no item 3.6.2.

3.7.3 Infestação de *Fop* no substrato

A infestação de *Fop* no substrato foi baseada na metodologia de Chaudhary et al. (2006). Utilizaram-se vasos com capacidade de 2L, os quais foram preenchidos com o substrato comercial Basaplan®, a uma profundidade de 10 cm. Após, foi depositado mais uma camada de 2 cm de vermiculita sob o substrato. As colônias de *Fop* foram removidas das placas de Petri e transferidas para os vasos. A camada de inóculo foi então coberta com 1 cm de vermiculita e foram semeadas 10 sementes de feijão em cada vaso. As sementes foram cobertas com mais uma camada de 2 cm de vermiculita e umedecidas com água. A testemunha consistiu em sementes saudáveis, isentas de tratamento com os produtos químicos e biológicos.

3.7.4 Preparo das amostras

Para determinar a taxa de transmissão, foram retirados fragmentos de cerca de 3 cm da região da raiz primária e da região do hipocótilo de plantas assintomáticas e sintomáticas, em estágio V4. Em seguida, esses fragmentos foram seccionados e submetidos à assepsia com álcool 70% por 30 segundos, emergidos, posteriormente, em hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos, enxaguados duas vezes em água destilada esterilizada e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram mantidas em câmara de incubação a 20°C e fotoperíodo de 12 horas. Diariamente foram feitos exames de todos os fragmentos,

onde foi possível registrar a formação de micélio do fungo sob a superfície dos mesmos três dias após a incubação.

A taxa de transmissão foi obtida considerando-se o número de fragmentos com crescimento micelial em função do número de plantas avaliadas em cada parcela. O resultado foi expresso em porcentagem de fragmentos infeccionados.

O experimento foi realizado em blocos casualizados, com quatro repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 5% de probabilidade, usando a transformação $\sqrt{x+1}$ para as porcentagens obtidas no hipocótilo das plantas e a transformação arco seno $\sqrt{x/100}$ para os dados obtidos na raiz principal. As análises foram feitas através do programa estatístico Assistat versão beta 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes de antagonismo *in vitro* de *Fop* a *Trichoderma*

Com respeito ao teste de pareamento *in vitro*, foi possível verificar que os três isolados de *Trichoderma* foram responsáveis pela redução do crescimento micelial de *Fop*, destacando-se os isolados Fus-AV e Fus-CB, os quais foram mais competitivos e reduziram cerca de 20% o crescimento micelial do patógeno em relação à testemunha (Figura 3).

Foi observado que o crescimento micelial do isolado IAC 11.299-1 foi inferior aos demais isolados. Esta diferença pode ser devido ao fato deste isolado estar preservado há mais tempo e por isso ter apresentado menor velocidade de crescimento. Os outros dois isolados de *Fusarium* foram obtidos mais recentemente, de plantas com sintomas, e, portanto, estavam preservados há pouco tempo.

Figura 3 - Crescimento micelial de três isolados de *Fop* após cinco dias de cultivo pareado com isolados de *Trichoderma* spp

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. C. V.(Coeficiente de variação): 5,70

De acordo com a escala de Bell et al. (1982), todos os isolados de *Trichoderma*, quando confrontados com os isolados Fus-AV e Fus-CB, revelaram-se bons antagonistas contra o patógeno, pois ocuparam metade da superfície do meio, configurando-os na classe 3 (Tabela 7). Já para o isolado IAC 11.299-1, os agentes

de biocontrole apresentaram maior antagonismo, os quais ocuparam mais de 70% da superfície do meio de cultura (Figura 4). Infere-se que o lento crescimento deste isolado contribuiu para um maior antagonismo por parte dos agentes biológicos.

Tabela 7 - Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. através do antagonismo *in vitro*, conforme escala de Bell et al. (1982)(1), com nove dias de cultivo pareado

Isolado de <i>Trichoderma</i> spp.	Fus-AV	Fus-CB	IAC 11.299-1
T12-1086G05 (<i>T. harzianum</i>)	3	3	2
SF 04 (<i>T. asperellum</i>)	3	3	2
GF 422 (<i>T. asperellum</i>)	3	3	2

(1) Classe 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Classe 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa

O antagonismo exibido pelos isolados de *Trichoderma*, no presente trabalho, diverge daquele avaliado por Carvalho et al. (2011). Embora tenha sido empregada uma metodologia semelhante, os autores identificaram a inibição total do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* pelos isolados de *T. harzianum* CEN 238, CEN 239 e CEN 241, agrupando-os na classe 1. Em um ensaio similar, visando potenciais antagonistas localizados no solo da Arábia Saudita, Alwathnani et al. (2012) observaram que *T. harzianum* inibiu em 59,8% o crescimento micelial de *Fop* em condições *in vitro*.

Figura 4 - Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Fop*, aos nove dias, em cultivo pareado

Na literatura, existem diversos relatos baseados na escala proposta por Bell et al. (1982), que evidenciam o antagonismo de *Trichoderma* em meio de cultura, particularmente contra patógenos habitantes de solo. Silva et al. (2014) classificaram

T. longibrachiatum, *T. harzianum* e *T. viride* na classe 1, observando-se um alto antagonismo *in vitro* destas espécies contra três isolados de *Fusarium solani*. Para a inibição de *Rhizoctonia solani*, Sudo-Martelletto et al. (2013), classificaram os isolados TENA7 e TENA33 de *Trichoderma* spp., oriundos de raízes de tomateiro, nas classes 1 e 1,5, independente do cultivo em meio de cultura ser ácido ou neutro. Dentre 20 isolados de *Trichoderma* spp., obtidos da rizosfera da cultura de morango, Isaías et al. (2014) observaram que o isolado CEN691 foi o único que apresentou grau máximo de antagonismo contra *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*.

Quanto ao teste de produção de metabólitos voláteis, foi observado que a produção dessas substâncias exibiu ação antifúngica e diferiram entre si em todos os isolados de *Trichoderma* spp. comparados (Tabela 8).

Neste teste, o tratamento T12-1086G05 ocasionou as maiores porcentagens de redução do crescimento micelial de *Fop*, as quais foram, respectivamente, 10, 17 e 50% para os isolados Fus-AV, Fus-CB e IAC 11.299-1.

O agente biológico SF 04 inibiu em torno de 9% os isolados Fus-AV e Fus-CB, e em 48% o isolado IAC 11.299-1. Já o isolado GF-422 inibiu aproximadamente 14 e 39%, respectivamente, os isolados Fus-CB e IAC 11.299-1; e não foi capaz de reduzir o crescimento do isolado Fus-AV.

A maior capacidade do isolado T12-1086G05 em reduzir o crescimento de *Fop*, em relação aos outros dois isolados, pode ser atribuída pela diferença de espécies dos antagonistas avaliados. O isolado T12-1086G05 pertence à espécie *Trichoderma harzianum*, enquanto os demais são de *Trichoderma asperellum*. Similarmente, Carvalho et al. (2014) constataram que isolados de *T. harzianum* (CEN 287, CEN 288, CEN 289 E CEN 316) apresentaram ação antifúngica, através de metabólitos voláteis, reduzindo em 23 a 40% o crescimento micelial de *Fop*. Ribas et al. (2014) constataram que os isolados ICB07, ICB11, ICB12, ICB16, ICB20 e ICB21 reduziram em, aproximadamente, 33% o diâmetro da colônia de *Fop*. Já Santos et al. (2014) identificaram os isolados CEN 1289, CEN 1275 e CEN 1277 como potenciais agentes de biocontrole contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*. Auler et al. (2013), avaliando o crescimento micelial *in vitro* de *T. harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii*, detectaram 13 isolados provenientes do solo que foram capazes de ocupar, pelo menos, 66% da superfície do meio, em temperaturas de 22°C, 25°C e 28°C.

Tabela 8 - Efeito de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial (%) de *Fop*

Isolados de <i>Fop</i>	Antagonistas			
	T12-1086G05	SF 04	GF-422	Média
Testemunha ⁽²⁾	100 aA ⁽¹⁾	100 aA	84,90 bB	94,96 a
Fus- Avaré	84,55 bB	91,55 bA	89,51aA	88,53 b
Fus - Capão Bonito	78,14 cB	91,41 bA	81,17 bB	83,56 c
IAC 11.299-1	49,47 dB	52,38 cB	59,43 cA	54,87 d
Média	78,03 B	83,83 A	78,75 B	
C.V. ⁽³⁾ (%)	4,92			

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. ⁽²⁾ Sem adição do disco do antagonista na placa correspondente. ⁽³⁾ C.V.: Coeficiente de variação

A capacidade de metabólitos voláteis em inibir o crescimento de fungos foi observada por Raut et al. (2014), cujos isolados de *Trichoderma* (T36 e T50) reduziram de 30 a 40% o crescimento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum* e *Pythium ultimum*.

Menores porcentagens do crescimento micelial foram observadas para o isolado IAC 11.299-1, e o fato mencionado no teste anterior, acerca do seu lento crescimento, justifica esses valores inferiores. Deste modo, somente o efeito dos metabólitos voláteis não deve ser considerado como o fator primordial nos dados obtidos nestes tratamentos envolvendo o isolado IAC 11.299-1.

A redução do crescimento de *F. oxysporum*, observada nos testes de antagonismo por cultura pareada e produção de metabólitos voláteis, está relacionada com propriedades inerentes do gênero *Trichoderma*, os quais são: a competição por espaço e por nutrientes presentes no meio de cultura, o micoparasitismo e a antibiose (ÁVILA et al., 2005; ETHUR et al. 2008).

O micoparasitismo está relacionado com a capacidade de um fungo atacar o outro, através da produção de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular do fungo parasitado. Ao caracterizar 25 isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo exibido contra *Fop*, Ribas et al. (2014) observaram que todos os isolados produziram enzimas hidrolíticas. O crescimento micelial de *Fop* foi reduzido em até 50%, onde constatou-se a produção de glucanases, quitinases, ácido indolacético e sideróforos.

A antibiose, por sua vez, caracteriza-se pela liberação de metabólitos voláteis e não voláteis, os quais são tóxicos a fungos fitopatogênicos. O gênero *Trichoderma* pode produzir até 40 metabólitos secundários como o ácido harziânico, alameticina, tricolina, viridina, gliovirina, terricina e ácido aspergílico que dificultam o crescimento de microrganismos (HOWELL, 1998; PADMAJA et al., 2013).

Estes resultados, embora obtidos em condições *in vitro*, são relevantes no âmbito do manejo da murcha-de-fusário, pois segundo Luz (1991), produtos biológicos à base de *Trichoderma*, quando aplicados no tratamento de sementes, inibem o desenvolvimento de fitopatógenos aderidos em sua superfície (LUZ, 1991), através da dissolução da estrutura celular destes e independe do contato físico entre os microrganismos (BEDENDO et al., 2011).

As metodologias *in vitro* empregadas nesta etapa do trabalho, além de práticas, foram úteis para avaliar a capacidade antagonista dos isolados e podem auxiliar na seleção preliminar destes em ensaios voltados para o campo. No entanto, deve-se considerar que a eficiência em reduzir ou suprimir o crescimento do patógeno *in vitro* não implica em igual eficiência em controlar a doença em condições de casa-de-vegetação ou campo. Segundo Lorito et al. (2010), o primeiro efeito está diretamente relacionado à habilidade do *Trichoderma* em produzir enzimas hidrolíticas e compostos fungitóxicos. Já o biocontrole, propriamente dito, além de apresentar estes mecanismos, pode estimular os mecanismos de defesa e promover o desenvolvimento da planta, tendo o seu efeito relação direta com a adaptação dos agentes de biocontrole nas condições bióticas e abióticas do ambiente (DENNIS; WEBSTER, 1971a, b).

Portanto, em condições *in vitro*, os três produtos a base de *Trichoderma* spp. apresentaram capacidade antagonista contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, destacando-se o produto biológico a base de *Trichoderma harzianum*, T12-1086G05.

4.2 Sensibilidade *in vitro* de *Fop* a fungicidas

As concentrações inibitórias de 50% e 100% do crescimento micelial estão descritas na Tabela 9 e as porcentagens de inibição do crescimento micelial, representadas nas Figuras 5, 6 e 7.

A CI_{50} , isto é, a concentração de ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial, constitui um valor particular para cada fungicida e um determinado fungo. Quanto mais baixa for esta concentração, maior será a capacidade fungitóxica deste produto (REIS et al., 2007). Com isso, a CI_{50} também constitui uma referência para monitorar a resistência de patógenos a fungicidas, tendo em vista identificar, ao longo dos anos, se houve a perda da sensibilidade por parte do fungo a um determinado fungicida (DE ROSSI et al., 2015). Para o patossistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* - feijoeiro, estes produtos são exclusivamente utilizados no tratamento de sementes, e, até o momento, não há informações atuais a respeito desta fungitoxicidade na literatura.

No presente trabalho, os isolados de *Fop* foram classificados como altamente sensíveis aos fungicidas fludioxonil, carbendazim e difenoconazol. Observa-se uma diferença entre os valores de CI_{50} entre os isolados e fungicidas, mesmo quando esses apresentaram alta eficiência *in vitro*. Para o fludioxonil, os isolados apresentaram a CI_{50} entre 0,077 e 0,32 mg/L. Para o carbendazim, a CI_{50} ficou entre 0,07 e 0,13 mg/L, e para o difenoconazol, entre 0,09 e 0,38 mg/L.

Com relação aos fungicidas fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M e flutriafol, os isolados Fus-CB e Fus-AV, apresentaram, respectivamente, a CI_{50} inferior a 1,0 mg/L, sendo classificados como altamente sensíveis. No entanto, o isolado IAC 11.299-1 apresentou sensibilidade moderada a estes dois produtos, com uma CI_{50} entre 1,13 e 2,71 mg/L.

Os fungicidas difenoconazol e flutriafol, ambos enquadrados no grupo de triazóis, foram classificados como altamente fungitóxicos, com exceção do isolado IAC 11.299-1, o qual se mostrou moderadamente sensível ao flutriafol. Camargo (2013), ao avaliar a sensibilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* a fungicidas, constatou que o difenoconazol também foi classificado altamente fungitóxico. Já o flutriafol, neste caso, foi considerado moderadamente fungitóxico.

Tabela 9 - Equações de regressão, coeficientes de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) e 100% (CI_{100}) do crescimento micelial de *Fop* em relação aos fungicidas

Fungicidas	Isolados de <i>Fop</i>	Equação de Regressão	R^2	CI (mg/L)	
				CI_{50}	CI_{100}
Fludioxonil	Fus-AV	$**y = 34,127x + 87,982$	0,93	0,077	2,25
	Fus-CB	$y = 30,096x + 80,647$	0,89	0,095	4,39
	IAC 11.299-1	$y = 51,022x + 75,016$	0,62	0,32	3,08
Carbendazim	Fus-AV	$y = 48,244x + 92,592$	0,81	0,13	1,42
	Fus-CB	$y = 46,657x + 91,756$	0,91	0,13	1,50
	IAC 11.299-1	$y = 34,717x + 90,805$	0,97	0,07	1,84
Difenoconazol	Fus-AV	$y = 25,454x + 73,278$	0,97	0,12	11,21
	Fus-CB	$y = 19,839x + 70,988$	0,97	0,09	28,99
	IAC 11.299-1	$y = 29,663x + 62,289$	0,97	0,38	18,67
FTM*	Fus-AV	$y = 34,08x + 60,926$	0,91	0,51	8,84
	Fus-CB	$y = 37,929x + 72,819$	0,97	0,25	5,20
	IAC 11.299-1	$y = 45,407x + 47,644$	0,82	1,13	14,22
Flutriafol	Fus-AV	$y = 22,038x + 51,982$	0,96	0,81	150,96
	Fus-CB	$y = 19,949x + 60,366$	0,98	0,30	96,99
	IAC 11.299-1	$y = 17,152x + 42,572$	0,87	2,71	2.229
Tiofanato Metílico	Fus-AV	$y = 98,293x + 22,202$	0,99	1,91	6,18
	Fus-CB	$y = 91,514x + 15,129$	0,99	2,40	8,46
	IAC 11.299-1	$y = 88,45x + 28,631$	0,99	1,74	6,41
Tiabendazol	Fus-AV	$y = 125,35x + 10,948$	0,99	2,05	5,13
	Fus-CB	$y = 130,31x + 10,268$	0,84	2,01	4,88
	IAC 11.299-1	$y = 116,34x + 14,782$	0,95	2,00	5,40
Tiram	Fus-AV	$y = 41,584x - 24,499$	0,96	61,87	986,0
	Fus-CB	>50			
	IAC 11.299-1	>50			
Captana	Fus-AV	>50			
	Fus-CB	>50			
	IAC 11.299-1	>50			
Metalaxil-M	Fus-AV	>50			
	Fus-CB	>50			
	IAC 11.299-1	>50			

* FTM: Fludioxonil + tiabendazol + metalaxil-M

** y = crescimento micelial; x = concentração do fungicida

Todos os isolados foram classificados como moderadamente sensíveis ao tiofanato metílico e ao tiabendazol, pois apresentaram uma CI_{50} entre 1,74 a 2,50 mg/L. Estes resultados corroboram com Batista et al. (2002), ao verificarem que o tiofanato metílico foi incapaz de inibir satisfatoriamente o crescimento e a

esporulação de dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, ao passo que o carbendazim foi eficiente na inibição deste patógeno.

Nota-se que os produtos carbendazim, tiofanato metílico e tiabendazol, apesar de pertencerem ao grupo químico dos benzimidazóis, revelaram diferenças quanto à fungitoxicidade *in vitro*. O carbendazim apresentou-se altamente fungitóxico e, em contrapartida, os outros dois fungicidas, foram considerados moderadamente fungitóxicos. Dentre os fungicidas sistêmicos, os benzimidazóis são conhecidos devido à eficácia no controle de importantes doenças. Entretanto, o desenvolvimento de resistência a fungicidas deste grupo, tem sido reportado para uma gama de patógenos, como *Botrytis cinerea*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Corynespora cassiicola* (GHINI, 1987; GHINI; KIMATI; 2000; MARINGONI; BARROS, 2002; RODRIGUES et al., 2007; AVOZANI et al., 2014).

De acordo com a escala Edgington e Klew (1971), os fungicidas tiram captana e metalaxil-M foram considerados não tóxicos a *Fop*, pois na dose de 100 ppm, ocorreu o crescimento micelial dos isolados. Para esta mesma concentração, Reis (1993) relatou que benomil, captana e metalaxil, inibiram 100% do crescimento micelial de *Fop*. De outro modo, para controle *in vitro* de *Machopomina phaseolina*, tiram e captana na concentração de 40 mg/L de ingrediente ativo, não foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno (TONIN et al., 2013).

Tiram e captana pertencem aos grupos químicos dos ditiocarbamatos e dicarboximidas, os quais são utilizados, comumente, no tratamento de sementes de feijão. No entanto, apesar da captana ser registrado especialmente para controle de *F. oxysporum* em feijoeiro, observou-se neste trabalho a sua baixa fungitoxicidade aos três isolados avaliados. Para *Sclerotinia sclerotiorum*, ambos os ingredientes ativos foram medianamente tóxicos de acordo com Camargo (2013). De Rossi et al. (2015) verificaram que 10 isolados de *Exerohilum turcicum* foram classificados como insensíveis à captana, os quais exibiram uma CI_{50} superior a 50 mg/L.

O metalaxil-M é um fungicida que pertence ao grupo químico do acilalaninato, recomendado para o controle de oomicetos. No presente estudo, este ingrediente ativo foi utilizado com o intuito de verificar a sua eficiência na composição do fungicida à base de fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M. Assim como foi observado nos resultados obtidos, esperava-se que *F. oxysporum* fosse insensível a este anti-oomiceto. De outro modo, é possível notar a eficiência do fludioxonil e tiabendazol

nesta mistura, uma vez classificados, respectivamente, como altamente fungitóxico e moderadamente fungitóxico ao *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

De uma maneira geral, com base nos valores da CI_{50} obtidos, os ingredientes ativos carbendazim, difenoconazol, fludioxonil, flutriafol e fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M podem ser utilizados no tratamento de sementes de feijão, visando o controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Fludioxonil

Carbendazim

Difenoconazol

Concentrações mg L⁻¹

Figura 5 - Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Fop* pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial)

Fludioxonil+tiofanato metílico+metalaxil-M

Inibição do crescimento micelial (%)

Flutriafol

Tiofanato Metílico

Concentrações mg L⁻¹

Figura 6 - Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Fop* pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial)

Tiabendazol

Figura 7 - Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Fop* pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI₅₀= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial)

De acordo com Ávila et al. (2005), os ingredientes ativos de fungicidas podem interferir no desenvolvimento e nos mecanismos de ação dos agentes de biocontrole, fato este que justifica a importância de se verificar a compatibilidade entre os mesmos.

Em relação ao processo de inibição do crescimento micelial dos três isolados de *Trichoderma* spp. frente aos fungicidas, observa-se, na Tabela 10, uma variação nos valores de CI₅₀ obtidos. As porcentagens de inibição do crescimento micelial estão representados nas figuras 10, 11 e 12.

Com base na classificação de Edgington e Klew (1971), os agentes de biocontrole foram classificados como altamente sensíveis aos fungicidas carbendazim, tiabendazol e difenoconazol, os quais apresentaram uma CI₅₀ inferior a 1,0 mg/L. A toxicidade do carbendazim à *Trichoderma* sp. também foi confirmada por diversos trabalhos na literatura (SILVA et al., 1999; MALATHI et al., 2002; PANDOLFO, 2007; HETONG et al., 2008; NALLATHAMBI et al., 2009). Esta sensibilidade está atrelada pelo fato do *Trichoderma* não ser resistente ao grupo dos benzimidazóis (ZAMBOLIM et al., 2007), a exemplo do carbendazim e tiabendazol.

Tabela 10 - Equações de regressão, coeficientes de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e 100% (CI₁₀₀) do crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em relação aos fungicidas

Fungicidas	Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Equação de Regressão	R^2	CI (mg/L)	
				CI ₅₀	CI ₁₀₀
Carbendazim	GF 422	$y = 36,79x + 112,6$	0,95	0,02	0,45
	SF 04	$y = 59,029x + 130,69$	0,89	0,04	0,30
	T 12-1086605	$y = 104,27x + 212,94$	0,94	0,02	0,08
Difenoconazol	GF 422	$y = 28,723x + 95,774$	0,99	0,02	1,40
	SF 04	$y = 29,405x + 86,864$	0,99	0,05	2,80
	T 12-1086605	$y = 28,816x + 102,66$	0,95	0,01	0,62
Tiabendazol	GF 422	$y = 51,502x + 64,060$	0,98	0,53	4,99
	SF 04	$y = 57,999x + 52,718$	0,95	0,90	6,53
	T 12-1086605	$y = 60,036x + 65,683$	0,97	0,55	3,73
FTM*	GF 422	$y = 30,329x + 74,145$	0,95	0,16	7,12
	SF 04	$y = 28,783x + 76,160$	0,96	0,12	6,73
	T 12-1086605	$y = 23,793x + 51,343$	0,81	1,45	18,37
Fludioxonil	GF 422	$y = 40,277x + 87,136$	0,93	0,12	2,08
	SF 04	$y = 36,068x + 83,716$	0,85	0,12	2,82
	T 12-1086605	$y = 33,366x + 30,268$	0,96	3,90	123,0
Tiofanato Metílico	GF 422	$y = 67,513x + 20,069$	0,93	2,77	15,27
	SF 04	$y = 68,980x + 19,000$	0,92	2,81	14,94
	T 12-1086605	$y = 43,407x + 1,4860$	0,91	13,11	186,01
Flutriafol	GF 422	$y = 44,35x + 5,7268$	0,99	9,96	133,55
	SF 04	$y = 44,586x + 24,225$	0,84	3,79	50,76
	T 12-1086605	$y = 75,763x - 21,210$	0,95	8,70	39,78
Tiram	GF 422	$y = 63,173x - 61,279$	0,98	57,74	370,51
	SF 04	$y = 45,408x - 37,13$	0,98	82,95	1047,0
	T 12-1086605	$y = 75,326x - 80,232$	0,96	53,57	247,0
Captana	GF 422	>50			
	SF 04	>50			
	T 12-1086605	>50			
Metalaxil-M	GF 422	>50			
	SF 04	>50			
	T 12-1086605	>50			

* FTM: Fludioxonil + tiabendazol + metalaxil-M

** y = crescimento micelial; x = concentração do fungicida

Para três fungicidas, observou-se uma diferença na sensibilidade do isolado T 12-1086G05 com relação aos demais isolados. No caso dos fungicidas fludioxonil e fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M, o isolado T 12-1086G05 foi classificado como moderadamente sensível. No entanto, os isolados GF 422 e SF 04, apresentaram CI₅₀ equivalentes entre 0,12 e 0,16 mg/L comportando-se como altamente sensíveis

a estes dois fungicidas, como mostra a Figura 8. De maneira análoga, o isolado T 12-10866G0 apresentou-se pouco sensível ao tiofanato metílico, pois a sua CI_{50} foi de 13,11 mg/L, diferindo dos demais isolados, os quais apresentaram um valor de CI_{50} em torno de 2,80 mg/L. Ribas et al. (2009) verificaram a interferência dos fungicidas tiofanato metílico, captan, iprodiona e fluazinam no crescimento vegetativo e esporulação de cinco isolados de *Trichoderma* spp. Constatou-se que o tiofanato metílico foi compatível com os cinco isolados; captan foi compatível com três isolados e o carbendazim foi fungitóxico para todos os isolados, corroborando com os resultados deste trabalho e com Rezende (2011). Gowdar et al. (2006) verificaram que o carbendazim e o tiofanato metílico foram incompatíveis com *T. harzianum*, pois houve inibição de 100% do fungo após 72 horas de contato com tais fungicidas.

Figura 8 - Sensibilidade de *Trichoderma* spp. ao fungicida à base fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M

Em relação ao tiabendazol e flutriafol (Figura 9), todos os isolados foram classificados, respectivamente, como sensíveis e moderadamente sensíveis. A incompatibilidade de *Trichoderma* spp. ao fungicida tiabendazol também foi confirmada por Herrera et al. (2012) ao relatar que concentrações entre 0,63 mg/L e 1,80 mg/L foram capazes de inibir a germinação de conídios de isolados selvagens de *T. harzianum*.

Figura 9 - Sensibilidade de *Trichoderma* spp. ao fungicida flutriafol

Já para os fungicidas captana, tiram e metalaxil-M, os fungos foram classificados como insensíveis. A CI_{50} para o tiram variou entre 53,57 a 82,95 mg/L para os isolados. Pandya et al. (2012) também confirmaram a compatibilidade *in vitro* de *T. harzianum* com os fungicidas tiram e tiofanato metílico. Os fungicidas a base de captana e metalaxil-M, na maior dose comparada (100 ppm), não inibiram o desenvolvimento do *Trichoderma* spp., sendo recomendados por May e Kimati (2000) como compatíveis dentro do manejo integrado. Ranganathswamy et al. (2013) também encontraram valores de CI_{50} superiores a 100 ppm para inibir o crescimento micelial de isolados de *T. virens* e *T. harzianum*. Para captana, esses autores determinaram a CI_{50} na concentração de 172,60 mg/L, e para metalaxil-M, a CI_{50} foi de 421,70 mg/L. Ao avaliar a sensibilidade de *Trichoderma harzianum* a fungicidas utilizados para tratamento de sementes, Gowdar et al. (2006) verificaram que a captana e tiram podem ser combinados com os agentes de biocontrole. Pandolfo (2007) verificaram que a trifloxistrobina + propiconazol e carboxina + tiram apresentaram menor eficiência na inibição do crescimento micelial de *Trichoderma* sp.

Carbendazim

Inibição do crescimento micelial (%)

Difenoconazol

Tiabendazol

Concentrações mg L⁻¹

Figura 10 - Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Trichoderma* spp. pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial)

Fludioxonil+tiabendazol+metalaxil-M

Fludioxonil

Tiofanato Metílico

Concentrações mg L⁻¹

Figura 11 - Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Trichoderma* spp. pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial

Figura 12 - Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Trichoderma* spp. pelos fungicidas (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L); CI50= concentração inibitória de 50% do crescimento micelial)

A avaliação da sensibilidade de agentes biológicos frente aos defensivos químicos permite verificar a compatibilidade entre os produtos, possibilitando assim, o seu uso combinado dentro de um manejo integrado de doenças. Fundamentando-se nesses dados, os fungicidas tiofanato metílico, flutriafol e fludioxonil provavelmente podem ser compatíveis com os produtos biológicos, visto que tais fungicidas não inibiram completamente o crescimento de *Trichoderma* spp. e são comumente utilizados no tratamento de sementes de feijão.

Outro ponto a ser levantado é que, na literatura, assim como realizado no presente trabalho, a sensibilidade dos patógenos frente aos fungicidas é classificada de acordo com os critérios de Edginton e Klew (1971). Nesta escala, os fungicidas

são classificados em altamente eficiente ($CI_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$), moderadamente eficiente (CI_{50} entre 1 e 10 mg L^{-1}), pouco eficiente (CI_{50} entre 10 e 50 mg L^{-1}) e ineficiente ($> 50 \text{ mg L}^{-1}$). Entretanto, esta forma de classificação deve ser questionada, pois atualmente o advento de novas moléculas garantiu uma maior fungitoxicidade inerente ao produto e, conseqüentemente, os fungicidas tornaram-se mais eficientes a partir de doses bem inferiores. Diante deste fato, no contexto atual, outros critérios de classificação devem ser propostos, com o objetivo de discriminar mais precisamente os valores de CI_{50} obtidos dos fungicidas.

No presente trabalho, embora não tenha sido encontradas CI_{50} inferiores a $0,01 \text{ mg L}^{-1}$, fica a proposta de uma outra escala para classificar a fungitoxicidade dos fungicidas (Tabela 11). Nesta escala, os fungicidas seriam classificados em seis categorias, sendo: altamente eficiente, muito eficiente, eficiente, moderadamente eficiente, pouco eficiente e ineficiente.

Blum (2009) propôs uma nova classificação de sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas, realizando testes em condições *in vitro* e *in vivo*. De acordo com o seu trabalho, os fungicidas são classificados como altamente fungitóxico quando apresentam uma CI_{50} menor que $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, fungitóxicos com uma CI_{50} entre $0,1$ e 20 mg L^{-1} , moderadamente fungitóxicos com uma CI_{50} entre 21 e 100 mg L^{-1} e atóxicos quando apresentarem uma CI_{50} maior do que 100 mg L^{-1} .

Tabela 11 - Proposta de uma nova escala para classificar a fungitoxicidade dos fungicidas

CI_{50}	Eficiência	Sensibilidade
$<0,01$	Altamente eficiente	Altamente sensível
$0,01 - 0,1$	Muito eficiente	Muito Sensível
$0,1 - 1,0$	Eficiente	Sensível
$1,0 - 10$	Moderadamente eficiente	Moderadamente sensível
$10 - 50$	Pouco eficiente	Pouco sensível
>50	Ineficiente	Insensível

4.3 Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico em sementes artificialmente inoculadas com *Fop*

Após a inoculação das sementes de feijão, com as colônias de *Fop* por seis horas, obteve-se, na testemunha, 88% de sementes contaminadas. Na análise sanitária das sementes tratadas, todos os produtos mostraram-se eficientes no controle do patógeno, com exceção do flutriafol, cuja porcentagem de controle não diferiu da testemunha (Tabela 12).

O controle de *F. oxysporum* foi variável entre os tratamentos, onde, isoladamente, os agentes biológicos reduziram em 66 a 68% a incidência do patógeno (Figura 13), e os fungicidas, por sua vez, cerca de 30% (Figura 14). Isto demonstra que, em alguns casos, os isolados de *Trichoderma* spp. podem ser mais efetivos no controle de patógenos de solo do que os fungicidas. Ethur et al. (2008) verificaram que a microbiolização de sementes de tomate com o isolado HTSR5 (*T. harzianum*) reduziu em 56% a incidência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, e o fungicida tiram, por sua vez, reduziu em 15%. Na Índia, Raju et al. (1999) constatarem uma redução de 67% de *Fusarium verticillioides* inoculado em sementes de sorgo que foram tratadas com *T. harzianum*.

Figura 13 - Sementes de feijão inoculadas com *Fop*: testemunha (placa à esquerda) e tratamento biológico com isolado SF 04 (*T. asperellum*) (placa à direita)

Figura 14 - Sementes de feijão inoculadas com Fop: testemunha (placa à esquerda) e tratamento químico com fludioxonil (placa à direita)

Nos Estados Unidos, Howell (2007) relata que o isolado G-6 (*T. virens*) foi eficiente ao ser aplicado em sementes de algodão cultivadas em solo infestado com *Pythium* sp. e *Rhizoctonia solani*. O agente biológico garantiu 20% a mais de plantas saudáveis do que o tratamento com fludioxonil, carbendazim+PCNB e chloroneb, sozinhos.

No entanto, no Brasil, sabe-se que até então, alguns trabalhos relatam que os fungicidas apresentam maior eficiência do que os produtos biológicos na erradicação de patógenos associados às sementes. Nesse quesito, Carvalho et al. (2011), ao avaliarem seis isolados de *Trichoderma harzianum*, identificaram que os isolados CEN202, CEN234, CEN238 e CEN 240 reduziram em 35 a 51% a incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes de feijão. O controle promovido por tais isolados não superou o fungicida carboxin+tiram, o qual foi responsável pela redução de 73% a incidência do patógeno. Em sementes de soja, Mertz et al. (2009) verificaram que os tratamentos com carbendazim+tiram, carboxin+tiram e difenoconazol+metalaxil foram mais eficientes do que o produto Biotrich (*Trichoderma* spp.), na erradicação de *Phomopsis* spp. e *Fusarium* spp.

Os produtos químicos, uma vez combinados com os produtos biológicos, foram capazes de reduzir significativamente a incidência de *Fop*. No caso do fludioxonil, esta associação resultou em uma incidência entre 20 a 34%, equivalendo à obtida pelo *Trichoderma* spp. sozinho. As formulações de *Trichoderma* testadas por Lobo Júnior et al. (2009) também apresentaram compatibilidade com este ingrediente ativo. O fludioxonil também tem sido utilizado em combinação com outros produtos biológicos comerciais, a base de *Streptomyces* sp. e *T. harzianum*.

para controle da murcha do ciclame, causada por *F. oxysporum* f. sp. *cyclamen* (ELMER; MCGOVERN, 2004).

Já para a associação entre o flutriafol e produtos biológicos (SF 04, GF 422 e T12-1086G05) as incidências de *Fop* foram, respectivamente, de 54%, 42% e 58%. Embora estas combinações não tenha promovido um controle equivalente aos fungicidas biológicos sozinhos, vale constatar que houve um maior controle do patógeno em comparação ao tratamento com o flutriafol isolado, cuja incidência de *Fop* foi de 80%.

Os tratamentos mais eficientes foram com tiofanato metílico e os três produtos biológicos, os quais promoveram um controle entre 90 a 95% de *Fop* (Figura 15).

Figura 15 - Sementes de feijão inoculadas com *Fop*: testemunha (placa à esquerda) e tratamento com tiofanato metílico+SF 04 (placa à direita)

Em termos de qualidade sanitária, infere-se que os agentes biológicos, quando combinados com fungicidas químicos, podem potencializar o efeito destes últimos, ao suprimir o desenvolvimento do patógeno. Howell (2007) relata o efeito protetor da combinação de *Trichoderma virens* com fungicidas em sementes de algodão, no controle de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia solani*. As porcentagens de plantas saudáveis foram superiores à testemunha nas combinações do isolado G-6 com chloroneb (93%), chloroneb+metalaxyl (80%), carboxin (60%) e carboxin+PCNB (53%).

Tabela 12 - Efeito dos tratamentos químico e biológico na análise sanitária de sementes de feijão artificialmente inoculadas com *Fop*

Tratamento	Incidência <i>Fop</i> (%)
Testemunha	88 a
Fludioxonil	66 b
Flutriafol	80 a
Tiofanato metílico	62 b
SF 04	30 c
GF 422	28 c
T12-1086G05	28 c
Fludioxonil + SF 04	34 c
Fludioxonil + GF 422	30 c
Fludioxonil + T12-1086G05	20 c
Flutriafol + SF 04	54 b
Flutriafol + GF 422	42 c
Flutriafol + T12-1086G05	58 b
Tiofanato metílico + SF 04	4 d
Tiofanato metílico + GF 422	8 d
Tiofanato metílico + T12-1086G05	6 d
Média	39,34
C.V. (%)	27,57

Médias, seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Outros estudos apontam a potencial associação de fungicidas químicos e biológicos, como o carboxin+tiram juntamente com *Agrotrich* (*Trichoderma* spp.), os quais reduziram totalmente *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. em sementes de soja (BRAND et al., 2009). Em sementes de trigo, a combinação entre difenoconazole e *Paenibacillus macerans* reduziu significativamente *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici* e *Aspergillus* spp. Esta combinação ainda promoveu aumentos na germinação e no rendimento de grão em condições de campo (LUZ, 2003). O mesmo autor relata em outro trabalho, que *P. macerans* associado com fludioxonil+metalaxyl-M eliminou por completo *F.*

graminearum, *F. verticillioides*, *Diplodia maydis* e *Aspergillus* spp. em sementes de milho. Visando a proteção de mudas de tomateiro, Ethur et al. (2008) verificaram que a mistura de tiram e o isolado HTSR5 (*T. harzianum*) reduziu em 33% a incidência de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* nas sementes.

Na tabela 13, observa-se que a inoculação de *Fop* afetou significativamente a germinação das sementes, sendo na testemunha sadia a porcentagem foi 82% e, na testemunha inoculada, 66%.

No entanto, a maioria dos tratamentos não afetou a germinação das sementes, com exceção dos tratamentos GF 422 e Flutriafol+GF 422. Neste caso, ambos os tratamentos prejudicaram a germinação das sementes, refletindo no maior número de plântulas anormais (Tabela 12).

Embora a germinação total não tenha sido prejudicada após as misturas de produtos químicos e biológicos, é importante observar que nestes tratamentos pode ocorrer o atraso da germinação, justificado pelos valores de primeira contagem nos tratamentos do fludioxonil com os produtos SF 04, GF 422 e do tiofanato metílico com GF 422.

No presente estudo, a presença do *Trichoderma* favoreceu a germinação das sementes de feijão, cujo incremento foi de 20 a 24% em relação à testemunha inoculada. Em sementes de feijão inoculadas com *Fop* e antagonistas biológicos, Alwathnani et al. (2012) afirmam que o biocontrole promovido por estes aumentaram em 30% a germinação das sementes. Os autores observaram que a porcentagem máxima foi obtida com *Trichoderma harzianum* (90%), seguido por *T. viride* (58%) e *Aspergillus niger* (33%).

A porcentagem de sementes mortas não diferiu estatisticamente da testemunha inoculada, salvo a mistura do flutriafol+SF 04.

Tabela 13 - Porcentagens da primeira contagem, germinação, plântulas anormais e sementes mortas de sementes de feijão 'BRS Estilo' inoculadas artificialmente com *Fop* e tratadas com produtos químicos e biológicos

Tratamento	1ª Contagem	Germinação	Plântulas anormais	Sementes Mortas
Testemunha sadia	78 a	82 a	18 b	0 b
Testemunha inoculada	60 b	66 b	26 a	8 a
Fludioxonil	67 a	76 a	14 b	10 a
Flutriafol	56 b	68 b	18 b	14 a
Tiofanato metílico	71 a	80 a	12 b	8 a
SF 04	72 a	78 a	14 b	8 a
GF 422	56 b	58 c	30 a	12 a
T12-1086G05	73 a	76 a	18 b	6 a
Fludioxonil + SF 04	60 b	76 a	10 b	14 a
Fludioxonil + GF 422	57 b	72 a	14 b	14 a
Fludioxonil+T12-1086G05	74 a	78 a	12 b	10 a
Flutriafol + SF 04	67 a	82 a	16 b	2 b
Flutriafol + GF 422	46 c	56 c	26 a	18 a
Flutriafol + T12-1086G05	67 a	76 a	12 b	12 a
Tiofanato metílico + SF 04	66 a	80 a	8 b	12 a
Tiofanato metílico + GF 422	45 c	68 b	20 b	12 a
Tiofanato metílico + T12-1086G05	73 a	80 a	12 b	8 a
Média	63 b	74 a	16 b	5,27 a
C.V. (%)	11,20	9,57	32,89	28,86

Médias, seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Os maiores comprimentos de raiz primária e comprimento total das plântulas foram obtidos nos tratamentos: fludioxonil, os três produtos biológicos e as misturas de fludioxonil+SF 04, fludioxonil+GF 422 e tiofanato metílico+SF 04. Quanto ao comprimento do hipocótilo, observa-se nos tratamentos tiofanato metílico, SF04, GF 422, fludioxonil+SF 04 e fludioxonil+GF422 o comprimento foi superior às testemunhas sadia e inoculada, embora não tenha ocorrido diferença estatística entre ambas.

O peso da massa seca foi superior às testemunhas na maioria dos tratamentos (Tabela 14).

Tabela 14 - Comprimento de raiz primária, hipocótilo, comprimento total e massa seca de plântulas oriundas de sementes de feijão 'BRS Estilo' inoculadas artificialmente com *Fop* e tratadas com produtos químicos e biológicos

Tratamento	Raiz primária (cm)	Hipocótilo (cm)	Comprimento total (cm)	Massa seca (g)
Testemunha sadia	10,56 a	3,42 b	13,98 a	0,026 c
Testemunha inoculada	7,70 b	3,33 b	11,04 b	0,027 c
Fludioxonil	8,96 a	3,34 b	12,04 a	0,035 b
Flutriafol	6,69 b	3,23 b	9,92 b	0,027 c
Tiofanato metílico	8,44 b	3,67 a	11,75 b	0,045 a
SF 04	8,77 a	4,55 a	13,23 a	0,041 a
GF 422	9,96 a	4,37 a	14,33 a	0,040 a
T12-1086G05	8,89 a	3,25 b	12,14 a	0,035 b
Fludioxonil + SF 04	10,23 a	3,69 a	13,81 a	0,037 b
Fludioxonil + GF 422	10,25 a	4,19 a	13,88 a	0,045 a
Fludioxonil + T12-1086G05	7,66 b	2,78 b	10,33 b	0,031 c
Flutriafol + SF 04	7,30 b	2,48 b	9,79 b	0,028 c
Flutriafol + GF 422	7,73 b	3,28 b	11,20 b	0,035 b
Flutriafol + T12-1086G05	7,08 b	2,27 b	9,35 b	0,025 c
Tiofanato metílico + SF 04	9,55 a	3,24 b	12,80 a	0,032 c
Tiofanato metílico + GF 422	8,26 b	3,29 b	11,55 b	0,040 a
Tiofanato metílico + T12-1086G05	6,56 b	2,52 b	9,08 b	0,031 c
Média	8,50 b	3,35 b	11,78 b	0,033 c
C.V. (%)	15,54	20,26	14,44	16,54

Médias, seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Em casa de vegetação o índice de velocidade de emergência foi significativo nos tratamentos com fludioxonil, tiofanato metílico, fludioxonil+T12-1086G05, tiofanato metílico+GF422 e tiofanato metílico+T12-1086G05. Embora o I.V.E. tenha sido igual à testemunha sadia somente para cinco tratamentos, observa-se que a porcentagem de emergência das plântulas não foi prejudicado (Tabela 15).

Tabela 15 - Índice de velocidade de emergência (I. V. E.) e porcentagens de emergência aos oito (E1) e aos dezesseis dias (E2), de plântulas oriundas de sementes de feijão inoculadas artificialmente com *Fop* e tratadas com produtos químicos e biológicos

Tratamento	I.V.E.	E ₁ (%)	E ₂ (%)
Testemunha sem patógeno	8,30 a	47 a	84 a
Testemunha com patógeno	6,55 b	32 a	61 b
Fludioxonil	7,90 a	49 a	73 a
Flutriafol	5,96 b	40 a	60 b
Tiofanato metílico	7,50 a	32 a	66 b
SF 04	7,00 b	40 a	73 a
GF 422	7,08 b	41 a	65 b
T12-1086605	6,58 b	50 a	72 a
Fludioxonil + SF 04	6,26 b	43 a	68 a
Fludioxonil + GF 422	6,93 b	44 a	69 a
Fludioxonil + T12-1086605	8,16 a	43 a	73 a
Flutriafol + SF 04	6,67 b	36 a	72 a
Flutriafol + GF 422	5,75 b	43 a	58 b
Flutriafol + T12-1086605	6,77 b	34 a	71 a
Tiofanato metílico + SF 04	7,02 b	47 a	66 b
Tiofanato metílico + GF 422	7,36 a	39 a	72 a
Tiofanato metílico + T12-1086605	7,67 a	43 a	74 a
Média	7,03 b	42,02 a	68 b
C.V. (%)	13,74	28,85	10,41

Médias, seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Para esta variável, embora não tenha ocorrido diferença estatística nos valores aos oito dias após a emergência, observa-se que, aos dezesseis dias, a

maioria dos tratamentos contribuiu com o aumento da emergência. Este resultado discorda de Mertz et al. (2009) ao avaliarem o efeito de fungicidas e bioprotetores aplicados em sementes de soja. Neste trabalho, a emergência de plantas foi bastante prejudicada, especialmente com *Trichoderma* spp., cuja emergência foi de 17%. Os melhores resultados foram obtidos com carbendazim+tiram, que assegurou uma emergência de 78%, seguido pelo tratamento com carboxin+tiram (57%).

Verificou-se que, os resultados obtidos no teste de porcentagem de emergência em casa de vegetação correspondem aos obtidos no teste de germinação em laboratório, onde três tratamentos (flutriafol, GF 422, flutriafol+GF422) não diferiram da testemunha inoculada.

Comparando todos os parâmetros avaliados, enfatiza-se a ineficiência dos tratamentos com flutriafol e GF 422 isolados, assim como a sua mistura.

Com base nos resultados obtidos, observa-se que o tratamento de sementes, uma vez feito com os produtos adequados, é capaz de promover o aumento do vigor das plantas. Consequentemente, as plantas terão melhor desenvolvimento, e maior tolerância às adversidades encontradas no campo (EL-ABYAD et al., 1993). Segundo Canteri et al. (1999) plantas de feijão com maior índice de velocidade de emergência, maior massa tanto radicular quanto foliar, tornam-se menos sensíveis ao ataque de patógenos de solo, como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Fusarium solani* entre outros.

No entanto, vale ressaltar que o tratamento de sementes não visa essencialmente aumentar o poder germinativo e a emergência das plântulas, mas sim reduzir a níveis mais baixos possíveis a taxa de transmissão de patógenos associados às sementes (FORCELINI, 1992).

Além do controle de doenças propriamente dito, muitas linhagens de *Trichoderma* são capazes ainda, de degradar moléculas de fungicidas químicos, tornando o uso simultâneo de fungicidas químicos e biológicos uma prática viável, considerando o manejo integrado de doenças (ALVARENGA et al., 2007). Dados publicados por Melo et al. (2001) revelaram que o gênero *Trichoderma* são hábeis em degradar o metalaxil ao mesmo tempo que em que estariam inibindo *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora*. Nessa estratégia, doses subletais do princípio ativo enfraquecem as estruturas do fitopatógeno, tornando-o mais suscetível à ação do antagonista e, após ter desempenhado sua função, vem a ser degradado pelo *Trichoderma* (MELO et al., 2001).

Nesse sentido, convém relacionar a forma como o tratamento de sementes é feito no campo, considerando a viabilidade do agente de biocontrole após o contato com o fungicida químico. No presente estudo, o efeito protetor do *Trichoderma* não foi afetado, apesar dos produtos estarem incorporados em uma única calda. Considerando situações em que o fungicida químico é aplicado nas sementes em um primeiro momento e, em seguida, o produto biológico, espera-se que haja maior viabilidade e eficiência por parte do agente de biocontrole.

4.4 Efeitos dos tratamentos químicos e biológicos em sementes de feijão na transmissão de *Fop* infestado no solo

Embora não tenham surgido sintomas típicos da murcha de fusário nas plantas aos 25 dias após a semeadura, foi possível verificar a transmissão do fungo, proveniente do solo, para plantas de feijão que estavam assintomáticas.

Neste teste, houve maior colonização de *Fop* na região do hipocótilo (42,5%) em relação à região da raiz principal (30%). No entanto, na literatura, a maioria dos trabalhos relata a transmissão de *Fop* principalmente através de sementes artificialmente ou naturalmente infectadas, sendo escassas informações a respeito da transmissão do fungo via solo. Sousa (2014) ao verificar a transmissão de *Fop* de sementes artificialmente inoculadas, detectou maior colonização do patógeno no hipocótilo do que nas raízes, cotilédones e primeiro entrenó. Em seu trabalho, foram obtidas colonizações de *Fop* no hipocótilo, em torno de 55,8% e 57,6%, respectivamente, a temperaturas de 20°C e 25°C nas cultivares Ouro Negro e Majestoso. Anteriormente, a eficiência de transmissão de *Fop* também foi publicada por Santos et al. (1996), cujo trabalho mostrou que sementes de feijão infectadas com 14% do patógeno podem transmiti-lo para as plantas (42,8%).

Foram observadas menores porcentagens de transmissão de *Fop* no hipocótilo das plantas de feijão cujas sementes haviam sido tratadas com fludioxonil, tiofanato metílico, GF 422, T12-1086G05, fludioxonil+GF422 e tiofanato metílico+GF422 (Figura 16).

TM: tiofanato metílico

Figura 16 - Porcentagem de transmissão de *Fop* do solo para o hipocótilo de plantas de feijoeiro aos 25 dias após a semeadura

Com relação à infecção de *Fop* nas raízes, obteve-se maior proteção destas com os tratamentos: fludioxonil, SF 04, T12-1086G05, fludioxonil+GF 422, fludioxonil+T12-1086G05, flutriafol+SF 04 e tiofanato metílico+GF 422 (Figura 17).

TM: tiofanato metílico

Figura 17 - Porcentagem de transmissão de *Fop* do solo para a raiz principal de plantas de feijoeiro aos 25 dias após a semeadura

Para Reis et al. (1988), o tratamento de sementes não deve objetivar a proteção contra o inóculo presente no solo ou em restos culturais, pois estes devem ser erradicados, preferencialmente, pela rotação de culturas. Concordando, Mehta (1978) coloca que, se, além da semente, o solo estiver altamente infestado com o patógeno, além de antieconômico, o tratamento de sementes será de pouca ou nenhuma importância prática.

Comparando-se os resultados obtidos com os testes envolvendo a inoculação de *Fop* nas sementes, constata-se maior eficiência dos tratamentos em termos de erradicação do fungo associado às sementes, sendo por outro lado, mínima a proteção oferecida quando este encontrava-se infestado no solo.

5 CONCLUSÕES

- Em condições *in vitro*, os três produtos a base de *Trichoderma* spp. apresentaram como bons antagonistas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.
- A partir dos testes de sensibilidade *in vitro*, os fungicidas tiofanato metílico, flutriafol e fludioxonil podem ser compatíveis com os produtos biológicos SF 04, GF 422 e T12-1086G05.
- A maioria dos tratamentos avaliados, exceto os tratamentos com flutriafol e GF 422 isolados e a sua mistura, foi eficiente na erradicação de *Fop* nas sementes de feijão, sem afetar a sua qualidade fisiológica.
- Os tratamentos químico e biológico promoveram maior controle através da erradicação de *Fop* nas sementes de feijão do que proteção a estas contra o patógeno presente no solo.
- As realizações de testes em condição *in vitro* são uteis na seleção de agentes de biocontrole.

REFERÊNCIAS

- ABAWI, G.S. Root rots. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. 2nd ed. Cali: CIAT, 1989. p. 105-157.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. Burlington: Elsevier Academic, 2005. 922 p.
- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 2014.
- ALVARENGA, D.O.; QUEIROZ, P.R.; ALMEIDA, A.M.; MELLO, S.C.M. Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 24 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 168).
- ALVES-SANTOS, F.M.; BENITO, E.P.; ESLAVA, A.P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 3335-3340, 1999.
- ALVES-SANTOS, F.M.; CORDEIRO-LOPEZ, L.; SAYAGUÉS, J.M.; MARTÍN-DOMINGUES, R.; GARCIA-BENAVIDES, P.; CRESPO, M.C.; DÍAS-DOMINGUES, J.M.; EESLAVA, A.P. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology**, Burlington, v. 51, p. 605-61, 2002.
- ALWATHNANI, H.A.; PERVEEN, K.; TAHMAZ, R.; ALHAQBANI, S. Evaluation of biological control potential of locally isolated antagonist fungi against *Fusarium oxysporum* under *in vitro* and pot conditions. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 6, n. 2, p. 312-319, 2012.
- ARMSTRONG G.M.; ARMSTRONG J.K. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.J. (Ed.). **Fusarium: disease, biology, and taxonomy**. University Park: Pennsylvania State University Press, 1981. p. 391–399.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE SEMENTES. **Anuário ABRASEM**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/estatisticas/index.asp>>. Acesso em: 29 jun. 2014.
- AULER, A.C.V.; CARVALHO, D.D.C; MELLO, S.C.M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro@mbiente On-line**, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, v. 7, n. 3, p. 359-365, 2013.
- AVENDAÑO, C.; ARBELÁEZ, G.; RONDÓN, G. Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em fríjol *Phaseolus vulgaris* L., mediante la acción combinada de *Entrophora colombiana*, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens*. **Agronomía Colombiana**, Bogota, v. 24, p. 62-67, 2006.

ÁVILA, Z.R.; CARVALHO, S.S.; BRAÚNA, L.M.; GOMES, D.M.P.A.; SILVA, M.C.F.; MELLO, S.C.M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 2005. 30 p. (Boletim Técnico, 177).

AVOZANI, A.; REIS, E.M.; TONIN, R.B. Sensitivity loss by *Corynespora cassiicola*, isolated from soybean, to the fungicide carbendazim. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 40, n. 3, p. 273-276, 2014.

AZEVEDO, L.A.S. Tratamento de sementes com fungicidas visando o controle de patógenos da parte aérea. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4., 1996, Gramado. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1996. p. 83-91.

BARBOSA, F.R.; GONZAGA, A.C.O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 247 p.

BARROS, S.T.; MENEZES, M. Levantamento da microflora fúngica de 23 cultivares de feijão-macassar (*V. unguiculata* (L.) Walp.), procedentes do município de Caruaru, Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 13., 1980, Itaguaí. **Programa e resumos...** Itaguaí: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1980. p. 143.

BARROS, S.T.; MENEZES, M.; FERNANDES, M.J.; LIRA, N.P. Fungos associados às sementes de 34 cultivares de feijão-macassar (*Vigna unguiculata*), no Estado de Pernambuco, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 85-95, 1985.

BATISTA, D.C.; OLIVEIRA, S.M.A.; TAVARES, S.E.E.H.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R.A.F.; SILVA, R.L.X. Efeitos de fungicidas sobre o crescimento in vitro *Fusarium oxysporum* f. sp. *passijlorae* e a interferência com *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 4, p. 305-308, 2002.

BEDENDO, I.P.; MASSOLA JR., N.S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.F. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 17, p. 367-388.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CONDÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. cap. 37, p.333-349.

BLUM, M.M.C. **Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. 2009. 164 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2008. p. 13-18.

BRAND, S.C.; ANTONELLO, L.M.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E.; SANTOS, V.J.; REINIGER, L.R.S. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja submetidas a tratamento com bioprotetor e fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 87-94, 2009.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria no. 3, de 5 de janeiro de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 06 jan. 2004. Seção 1, p. 35-41.

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

_____. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009b. 399 p.

BURLE, M.L.; FONSECA, J.R.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 121, p. 801-813, 2010.

BURUCHARA, R.A.; CAMACHO, L. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 39-45, 2000.

CAMARGO, M. **Sclerotinia sclerotiorum em sementes de soja: sobrevivência, efeito na germinação, tamanho de amostra para análise e eficiência in vitro de fungicidas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-04022014-135355/>>. Acesso em: 06 ago. 2014.

CANTERI, M.G.; PRIA, M.D.; SILVA, O.C. **Principais doenças fúngicas para manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEPG, 1999. 178 p.

CARDOSO, C.O.N.; KIMATI, N.H.; FERNANDES, N.G. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder, causando murcha vascular em feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 23, p. 273-276, 1966.

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, p. 36-42, 2011.

CHAUDHARY, S.; ANDERSON, T.R.; PARK, S.J.; YU, K. Comparison of screening methods for resistance to *Fusarium* root rot in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 303-308, 2006.

COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira 2009**. Florianópolis: EPAGRI, 2010. 164 p.

_____. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. 2. ed. Florianópolis: EPAGRI, 2012. 157 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**: v. 1 - safra 2013/14, n. 4 - quarto levantamento. Brasília, 2014. 67 p.

_____. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 2 - safra 2014/15, n. 412 - décimo segundo levantamento. Brasília, 2015. 134 p.

COSTA, J.G.C. **Feijão: morfologia**. AGEITEC: Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2014. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01_9_1311200215101.html>. Acesso em: 06 out. 2015.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, 2003.

CRAMER, R.A.; BYRNE, P.F.; BRICK, M.A.; PANELLA, L.; WICKLIFFE, E.; SCHWARTZ, H.F. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from common bean and sugar beet using pathogenicity assays and random-amplified polymorphic DNA markers. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 352-360, 2003.

CRUZ, B.P.B.; TERANISHI, J.; ISSA, E. Resistência de cultivares de feijão-vagem à murcha de *Fusarium*. **O Biológico**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 25-32, 1974.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. Podridões radiculares e Murcha-de-Fusarium. In: _____. (Ed.). **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010. p. 107-116.

DE ROSSI, R.L.; REIS, E.M.; BRUSTOLIN, R. Concentração de referência de fungicidas para a inibição miceliana de isolados de *Exserohilum turcicum* agente causal da hemintossariose do milho. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 41, n. 1, p. 25-30, 2015.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonist properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. **Transaction of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, n. 1, p. 25-39, Aug. 1971a.

_____. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, p. 363-369, 1971b.

DHINGRA, O.D.; NETTO, R.A.C. Reservoir and non-reservoir hosts of bean-wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 463-467, 2001.

DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M.; ALVES-SANTOS, F.M.; BENITO, E.P.; ESLAVA, A.P. *Fusarium* wilt of common bean in the Castilla y León region of Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 5, p. 600, 1996.

DONGO, S.L.; MÜLLER, L.E. Estudios sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en el frijol. II. Pruebas varietales. **Turrialba**, San Jose, v. 19, p. 82-90, 1969.

DUQUE S.L.; MÜLLER L.E. Estudio sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en frijol. I. Patogenesis histología sintomatologica. **Turrialba**, San Jose, v. 19, p. 71-81, 1969.

ECHANDI, E. Amarillamiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f. *phaseoli*. **Turrialba**, San Jose, v. 17, p. 409-410, 1967.

EDGINGTON, L.V.; KLEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.

EL-ABYAD, M.; EL-SAYED, M.A.; EL-SHANSHOURY, A.R.; EL-SABBAGH, S.H. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 149, n. 2, p. 185-195, 1993.

ELMER, W.; McGOVERN, R.J. Efficacy of integrating biological with fungicides for the suppression of *Fusarium* wilt of cyclamen. **Crop Protection**, Guilford, v. 23, p. 909-914, 2004.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; CAMARGO, R.F.; FLORES, M.G.V.; CRUZ, J.L.G.; MENEZES, J.P. *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 30, p. 57-69, 2008.

FAO. **FAOSTAT**. Rome, 2014. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 29 jun. 2014.

FERNÁNDEZ, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. Etapas de desarrollo em La planta de frijol. In: LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHIINHOVEN, A. van. (Ed.). **Frijol: investigación y producción**. Cali: CIAT, 1985. p. 61-78.

FORCELINI, C.A. **Incidência, transmissão e controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo**. 1992. 114 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

FREITAS, R.A. **Patologia de sementes de feijão**. Disponível em: <<http://www.patologiadesementes.com.br>>. Acesso em: 29 jun. 2014.

GHINI, R. Resistência de fungos a fungicidas do grupo dos benzimidazóis. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 13, n. 1/2, p. 74-76, 1987.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GOULART, A.C.P. Doenças do feijoeiro na região norte de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 230-232, 1988.

_____. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 72 p.

GOWDAR, S.B.; RAMESH-BABU, H.N.; NARGUND, V.B.; KRISHNAPPA, M. Compatibility of fungicides with *Trichoderma harzianum*. **Agriculture Science Digest**, Lafayette, v. 26, p. 279-281, 2006.

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

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

HENNING, A.A. **Tratamento e inoculação de sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1994. 6 p.

HERRERA, R.; NUNEZ, D.; ROMERO, N.; BESOAIN, X.; PEREZ, L.; MONTEALEGRE, J. Sensitivity of wild-type and mutant *Trichoderma harzianum* strains to fungicides: **Ciencia e Investigacion Agraria**, Santiago de Chile, v. 39, p. 569-576, 2012.

HETONG, Y.; RYDER, M.; WENHUA, T. **Toxicity of fungicides and selective medium development for isolation and enumeration of *Trichoderma* spp. in agricultural soils**. Vienna: International Subcomission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy, 2008. Disponível em: <http://www.isth.info/methods/method.php?method_id=8>. Acesso em: 01 out. 2015.

HOWELL, C.R. The role of antibiosis. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladium**. London: Taylor & Francis, 1998. v. 2: Enzymes, biological control, and commercial applications, p. 173-184.

_____. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

_____. Effect of seed quality and combination fungicide *Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and postemergence damping-off in cotton. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 1, p. 66–71, 2007.

IQBAL, A.M.; NEHVI, F.A.; DAR, S.A.; ALI, G. Health benefits associated with consumption of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Trends in Biosciences**, New Dehli, v. 5, n. 2, p. 97-100, 2012.

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

ITO, M.F.; CASTRO, J.L.; MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D. Importância do uso de sementes sadias de feijão e tratamento químico. **O Agrônomo**, Campinas, v. 55, p. 14-16, 2003.

KENDRICK, J.B.; SNYDER, W.C. Fusarium yellows of beans. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 32, n. 11, p. 1010-1014, 1942.

KINTSCHEV, M.R.; GOULART, A.C.P.; MERCANTE, F.M. Compatibilidade entre a inoculação de rizóbios e fungicidas aplicados em sementes de feijoeiro-comum. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 40, n. 4, p. 338-346, 2014.

KISTLER, H.C. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 474-479, 1997.

LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A.M.; CARVALHO, D.D.O. **Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 4 p.

LOBO JUNIOR, M.; SARTORATO, A.; COBUCCI, T. Qualidade e proteção de sementes. In: DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. (Ed.). **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010. p. 213-239.

LOHMANN, T.R.; PAZUCH, D.; STANGARLIN, J.R.; SELZEIN, C.; NACKE, H. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Cadernos de Agroecologia**, Recife, v. 2, n. 2, p. 1665-1668, 2007.

LOPES, R.B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 15–28.

LORITO, M.; WOO, S.L.; HARMAN, G.E.; MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 395–417, 2010.

LUCON, C.M.M. **Trichoderma no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo**. São Paulo: Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, 2008. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=77>. Acesso em: 10 ago. 2015.

LUZ, W.C. Avaliação dos tratamentos biológico e químico na redução de patógenos em sementes de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 93-95, 2003.

MACE, M.E.; BELL A.A.; BECKMAN C.H. **Fungal wilt diseases of plants**. New York: Academic Press, 1981. 640 p.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**. Lavras: UFLA, 1999. 107 p.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; PADMANABAN, P.; MOHANRAJ, D.; SUNDER, A.R. Compatibility of biocontrol agents with fungicides against red rot disease of sugarcane. **Sugar Technology**, Amsterdam, v. 4, n. 3/4, p. 131-136, 2002.

MARINGONI, A.C.; BARROS, E.M. Ocorrência de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes a fungicidas benzimidazóis. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 2, p. 197-200, 2002.

MARTINS-CORDER, M.P.P.; MELO, I.S. Antagonismo “in vitro” de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 1-7, 1998.

MASSOLA JR., N.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: BERGAMIN FILHO A.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 149-206.

MAY, L.L.; KIMATI, H. Controle de *Phytophthora parasitica* com fungicidas e efeito desses produtos no crescimento micelial de *Trichoderma*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 26, p. 52-57, 2000.

McCLEAN, P.E.; MYRES, J.M.; HAMMOND, J.J. Coefficient of parentage and cluster analysis of North American dry bean cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 1, p. 190-193, 1993.

MEHTA, Y.R. **Doenças do trigo e seu controle**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. 1920 p.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; OLIVEIRA, C.; HATANO, L.T. **Avaliação do efeito de pesticidas no crescimento de *Cercospora caricis***. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2003. 4 p. (Comunicado Técnico, 94).

MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa CNPDA, 1991. p. 135-156.

_____. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p.261-296, 1996.

_____. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v. 1, p. 17-67.

MELO, I.S.; LEVANTEZI, K.; SPESSOTO, A.M.; FEICHTENBERGER, E. Degradação do fungicida metalaxial por linhagens de *Trichoderma* spp. isoladas de solos rizosféricos. In: MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Org.). **Biodegradação**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 141-165.

MENEZES, M.; MACHADO, A.L.M.; SILVEIRA, M.C.V.; SILVA, R.L.X. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* com espécies de *Trichoderma* aplicadas no tratamento de sementes de feijão e no solo. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 133-140, 2004.

MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes**: detecção, danos e controle químico. São Paulo: CibaAgro, 1995. 321 p.

MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D.; NOVENBRE, A.D.L.C.; ITO, M.A. **Qualidade das sementes de feijão no Brasil**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/SementesFeijao/index.htm>. Acesso em: 29 jun. 2014.

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

MOHAN, S.K.; BIANCHINI, A.; MENEZES, R.J. **Doenças do feijoeiro no Estado do Paraná**: guia para identificação e controle. Londrina: IAPAR, 1983. 26 p.

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

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.9-2.13.

NALLATHAMBI, P.; UMAMAHESWARI, C.; THAKORE, B.B.L.; MORE, T.A. Post-harvest management of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk) fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) using *Trichoderma* species, fungicides and their combinations. **Crop Protection**, Guilford, v. 28, n. 6, p. 525-532, 2009.

NAVARINI, L.; CORTE, G.D.; DEBONA, D.; GULART, C.; FAVERA, D.D.; BALARDIN, R.S. Effect of acibenzolar-S-methyl alone and combined with fungicides on anthracnose and bacterial common blight in the bean crop. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 735-739, 2009.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan Press, 1979. 838 p.

NETTO, R.A.C.; DHINGRA, O.D.R. Hospedeiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 156-159, 1999.

PADMAJA, M.; NARENDRA, K.; SWATHI, J.; SOWJANYA, K. M.; JAWAHARBABU, P. In vitro antagonism of native isolates from *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, New Delhi, v. 4, n. 3, p. 886-891, 2013.

PANDOLFO, J.P. **Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/11189/>>. Acesso em: 06 ago. 2014.

PANDYA, J.R., SABALPARA, A.N., CHAWDA, S.K.; WAGHUNDE, R. R. Compatibility of *Trichoderma harzianum* with fungicides. **BIOINFOLET: A Quarterly Journal of Life Sciences**, Wageningen, v. 9, n. 4b, p. 695-696, 2012.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, n. 1, p. 23-54, 1985.

PASTOR-CORRALES, M.A.; ABAWI, G.S. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, p. 990-993, 1987.

PAULA JUNIOR, T.J. de; VIEIRA, R.F.; ZAMBOLIM, L.M. Manejo integrado de doenças do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, p. 99-112, 2004.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; COELHO, R.R.; CARNEIRO, J.E.S.; ANDRADE, M.J.B.; REZENDE, A.M. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009**. Viçosa: EPAMIG, CTZM, 2008. 180 p.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; COELHO, R.R.; CARNEIRO, PEREIRA, H.S.; SANTOS, J.B.; ABREU, A.F.B. Linhagens de feijoeiro com resistência à antracnoses selecionadas quanto a características agrônômicas desejáveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 209-215, 2004.

PEREIRA, C.O.F. **Estudo da patogenicidade e controle biológico de *Fusarium* sp. com *Trichoderma* sp.** 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2009.

PEREIRA, G.V.; YOKOYAMA, L.P. Produção e uso de sementes de feijão no Estado de Goiás. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 6., 1999, Salvador. **Resumos expandidos...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p. 580-583. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 99).

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições controladas. **Ciência Agrotecnológica**. Lavras, v. 35, n. 5, p. 940 -947, set./out. 2011.

RAJENDIRAN, R.; JEGADEESHKUMAR, D.; SURESHKUMAR, B.T.; NISHA, T. *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 6, n. 1, p. 31-35, 2010.

RAJU, N.S.; NIRANJANA, S.R.; JANARDHANA, G.R.; PRAKASH, H.S.; SHETTY, H.S.; MATHUR, S.B. Improvement of seed quality and field emergence of *Fusarium* moniliforme infected sorghum seeds using biological agents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 2, p. 206–212, 1999.

RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Cultivares. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1998. p. 435-449.

RANGANATHSWAMY, M.; PATIBANDA, A.K.; NAGESHWARA RAO, G. Evaluation of toxicity of agrochemicals on *Trichoderma* isolates *in vitro*. **Journal of Micology and Plant Pathology**, New Delhi, v. 51, n. 2, p. 289-293, 2013.

RAUT, I.; CALIN, M.; VASILESCU, G.; DONI, M.B.; SESAN, T.; JECU, L. Effect of non volatile compounds of *Trichoderma spp.* against *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. **Scientific Bulletin**. Series F. Biotechnologies, Zagreb, v. 18, p. 178-181, 2014.

RAVA, C.A.; SARTORATO, A., COSTA, J.G.C. Reação de genótipos de feijão comum ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 296-300, 1996.

REIS, A. **Controle de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. phaseoli Kendrick & Snyder, agente causal da murcha do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), através de isolados de *Trichoderma* e fungicidas**. 1993. 127 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1993.

REIS, A.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 16-20, 1995.

REIS, E.M.; PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M.C. **Estratégias para o controle de doenças do trigo**. Passo Fundo: EMBRAPA, CNPT, 1988. 50 p. (Documentos, 7).

REIS, E.M.; REIS, A.C.; CARMONA, M.A. **Manual de fungicidas**: guia para controle químico de doenças de plantas. 6. ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2010. 226 p.

REY, M.S.; LIMA, N.B.; SANTOS, J.; PIEROBOM, C.R. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthinum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 465-470, 2009.

REZENDE, A.A. **Eficiência de diferentes produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. no controle da podridão branca da haste da soja**. 2011. 120 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011. Disponível em: <http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFU_dd39b8d7e905048ddf07c287bb4a13c5/Details>. Acesso em: 27 out. 2015.

RIBAS, P.P.; MATSUMURA, A.T.S.; VAN DER SAND, S.T. Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 20, p. 97-107, 2014.

RIBEIRO, R.L.D.; HAGEDORN, D.J. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the causal agent of bean yellows. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 272-276, 1979.

RODRIGUES, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPÓSITO, M.B.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 323-327, 2007.

SANTOS, D.B.; MARQUES, E.; SILVA, J.B.T.; MARTINS, I.; MELLO, S.C.M. Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* *in vitro*. **Caderno de Agroecologia**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 1-5, 2014.

SANTOS, G.R.; COSTA, H.; PELUZIO, J.M.; MIRANDA, G.V. Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da micoflora associada às sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 43, n. 249, p. 621-627, 1996.

SANTOS, J.B.; GAVILANES, M.L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2008. p. 41-66.

SARTORATO, A. Fungicidas recomendados para tratamento de sementes de feijão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4., 1996, Gramado. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1996. p. 45-51.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Murcha ou amarelecimento de *Fusarium*. In: _____. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. p. 175-190, 1994.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; YOKOYAMA, M. **Principais doenças e pragas do feijoeiro comum no Brasil**. 3. ed. Goiânia: EMBRAPA, CNPAF, 1987. 53 p.

SARTORI, A.F.; REIS, E.M.; CASA, R.T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 456-458, 2004.

SCHWARTZ, H.F.; McMILLAN, M.S. Occurrence of *Fusarium* wilt of beans in Colorado. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 518, 1989.

SCHWARTZ, H.F.; STEADMAN, J.R.; HALL, R.; FORSTER, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. 2nd ed. Saint Paul: Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2005. 109 p.

SILVA, A.C.F.; ROSA, C.R.E.; MELO, I.S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 395-399, 1999.

SILVA, A.N.; AZEVEDO, G.B.; SOBRINHO, G.G.R.; NOVAES, Q.S. Effect of chemical products and use of the *Trichoderma* spp. for control of *Fusarium solani* in passion fruit trees: **Interciencia**, Caracas, v. 39, p. 398-403, 2014.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, G.C.; GOMES, D.P.; KRONKA, A.Z.; MORAES, M.H. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina Ciências Agrárias**. Londrina, v. 29, p. 29-34, 2008.

SINGH, S.P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 6, p. 1659-1675, 2001.

SOUSA, M.V. **Transmission, colonization and molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean seeds**. 2014. 119 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/1715>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

SUDO-MARTELLETO, M.; CARVALHO, A.O.; CARMO, M.G.F. Pareamento *in vitro* entre culturas de isolados de *Trichoderma* spp. e *Rhizoctonia solani*. **Revista de Ciências da Vida**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 78-92, 2013.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J.C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1045-1052, 2003.

TEIXEIRA, H.; PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; SILVA, M.B.; FERRO, C.G.; LEHNER, M.S. *Trichoderma* spp. decrease *Fusarium* root rot in common bean. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 38, n. 4, p. 334-336, 2012.

TOLEDO, F.F.; MARCOS FILHO, J. **Manual de sementes**: tecnologia da produção. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 224 p.

TOLEDO-SOUZA, E.D.; SILVEIRA, P. M.; CAFÉ-FILHO, A.C.; LOBO JÚNIOR, M. *Fusarium* wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 8, p. 1031-1037, Aug. 2012.

TOLEDO-SOUZA, E.D. de; SILVEIRA, P.M. da; LOBO JUNIOR, M.; CAFÉ FILHO, A.C. Sistemas de cultivo, sucessões de culturas, densidade do solo e sobrevivência de patógenos de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 971-978, 2008.

TONIN, R.F.B.; AVOZANI, A.; DANELLI, A.L.D.; REIS, E.M.; ZOLDAN, S.M.; GARCÉS-FIALLOS, F.R. In vitro mycelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n.4, p. 460-466, 2013.

UESUGI, C.H.; FREITAS, M.A.; MENEZES, J.R. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro, em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 324-324, 2003.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1993. 231 p.

VILELA, M.; MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; ASSIS, A.C.C. Qualidade de sementes de feijoeiro infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e viabilidade do fungo durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 54-59, 2010.

VILHORDO, B.W.; BURIN, M.E.; GANDOLFI, V.H. Morfologia. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1988. p. 87-124.

WOO, S.L.; ZOINA, A.; GEL, S.G.; LORITO, M.; NANNI, B.; SCALA, F.; NOVIELLO, C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 966–973, 1996.

ZAMBOLIM, L. **Sementes**: qualidade fitossanitária. Viçosa: UFV, DFP, 2005. 502 p.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W.S.; OLIVEIRA, S.H.F. **Manejo da resistência de fungos a fungicidas**. Viçosa: UFV, 2007. 168 p.

ZAMBOLIM, L.; VIEIRA, C.; ARAUJO, G.A.A.; CHAGAS, J.M.N.; SILVA, C.C. Ocorrência de murcha de *Fusarium* em feijoeiros na zona da mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 3, p. 287-288, 1987.